Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik im Klinikum
Steglitz der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Häring
Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
Leiter: Prof. Dr. med. R. Häring

VERSUCHE ZUR RADIOAKTIVEN MARKIERUNG VON LIPOPOLYSACCHARIDEN IM RAHMEN DER ENDOTOXINFORSCHUNG

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bettina Steinmüller
Berlin-Schöneberg

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549619_0034

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik im Klinikum
Steglitz der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Häring
Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
Leiter: Prof. Dr. med. R. Häring

VERSUCHE ZUR RADIOAKTIVEN MARKIERUNG VON LIPOPOLYSACCHARIDEN IM RAHMEN DER ENDOTOXINFORSCHUNG

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bettina Steinmüller
Berlin-Schöneberg

Referent: Prof. Dr. med. R. Häring

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Hahn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7. Februar 1985

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	5
1.1	Endotoxinämie im Verlauf bakterieller Infektionen	5
2	Fragestellung	8
3	Eigenschaften von Endotoxinen und Nachweismethoden	11
3.1	Eigenschaften von Endotoxinen	11
3.1.1	Biologische Eigenschaften	11
3.1.2	Chemische Eigenschaften	16
3.2	Nachweismethoden	24
3.2.1	Limulus-Test-Methode	24
3.3	Darstellung möglicher Markierungsverfahren	26
3.3.1	Methode nach Greenwood und Hunter	26
3.3.2	Methode nach Bolton und Hunter	30
4	Markierungsdurchführung	33
4.1	Greenwood-Hunter-Methode	33
4.1.1	Material und Geräte	33
4.1.1.1	Material	33
4.1.1.2	Geräte	34
4.1.2	Durchführung	35
4.1.3	Versuchsbedingungen	35
4.1.4	Ergebnisse	38
4.2	Bolton-Hunter-Methode	48
4.2.1	Material und Geräte	48
4.2.1.1	Material	48
4.2.1.2	Geräte	49
4.2.2	Durchführung	50
4.2.3	Versuchsbedingungen	50
4.2.4	Ergebnisse	50
5	Analytische Überprüfung der Endotoxine	52
5.1	Auswahl der Methoden	52
5.2	Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie)	52

5.2.1	Methode und Probenverarbeitung	54
5.2.2	Material und Geräte	54
5.2.2.1	Material	54
5.2.2.2	Geräte	54
5.2.3	Versuchsbedingungen	54
5.2.4	Auswertung der IR-Spektren	56
6	Diskussion	59
7	Zusammenfassung	62
8	Literaturverzeichnis	64
9	Danksagungen	71
10	Lebenslauf	72

1 EINLEITUNG

1.1 Endotoxinämie im Verlauf bakterieller Infektionen

Der septische Schock infolge einer massiven bakteriellen Infektion ist auch heute noch eine der schwersten Komplikationen im Bereich der operativen Medizin. Vor allem die bakterielle Peritonitis, überwiegend durch Gram-negative Erreger verursacht, stellt oft ein kaum beherrschbares Krankheitsbild dar, dessen Verlauf von der Menge und Schädlichkeit der in die Blutbahn eingeschwemmten Endotoxine abhängig ist.
Es sterben in Deutschland jährlich etwa 17000-18000 Menschen an den Folgen einer Peritonitis; die Peritonitis rangiert somit in der Häufigkeitsskala der verstorbenen chirurgischen Patienten an 5. Stelle (1).
Auch andere bakterielle Infektionen, wie z. B. die Pneumonie, intrauterine und urologische Infektionen, können zu einer Gram-negativen Sepsis mit systemischer Ausschwemmung von Endotoxinen führen und somit zu einer akuten Lebensbedrohung werden (Tab. 1). Die häufigsten Erreger der eben beschriebenen Infektionen sind Eschericha coli (E.coli), Klebsieller-Aerobacter, Pyocyaneus, Proteus und Pseudomonas aeruginosa (22, 1). Das klinische Bild eines durch diese Keime ausgelösten septischen Schocks ist geprägt durch Fieber, septisch-toxisches Kreislaufversagen mit Blutdruckabfall, intravasaler Gerinnung und Verbrauchskoagulopathie sowie Mikrothrombenablagerung mit irreversiblen Schockfolgen an Lungen-, Nieren- und Leberparenchym. Die Diagnose einer Endotoxinämie wird neben einer entsprechenden Anamnese durch den Nachweis der Erreger im zirkulierenden Blutstrom (Blutkultur) sowie durch den unmittelbaren Nachweis von Endotoxinen im Serum gesichert. Zusammenhänge zwischen nachgewiesener Endotoxinämie und Frühdiagnose, Verlaufsbeurteilung und Gesamtprognose einer bakteriellen Sepsis wurden nachgewiesen (9). Die klinische Wertigkeit des Endotoxinnachweises dagegen ist um-

stritten. Es wird jedoch beobachtet, daß die Schwere einer bakteriellen Sepsis von der Menge des eingeschwemmten Endotoxins abhängig ist und somit dem Endotoxin eine Schlüsselrolle im Verlauf einer Sepsis zukommt.
Die chirurgische Forschung hat sich daher in ihrem Bemühen, neue Wege in der Behandlung septischer Komplikationen, z. B. nach großen Bauchhöhleneingriffen, zu finden, in letzter Zeit auch zunehmend mit der Erforschung der Herkunft, der biologischen und chemischen Eigenschaften und der Abbaumechanismen der Endotoxine beschäftigt.

Tabelle 1: Spezifische Ursachen und Voraussetzungen für das Zustandekommen einer Sepsis (9, S. 634)

CHIRURGIE:
Perforation, Penetration im Gastrointestinaltrakt mit konsekutiver Peritonitis,
posttraumatische Infektionen von Weichteilen, Gelenken und Knochen,
Lungenkontusionen,
Verbrennungen,
allgemeine postoperative Komplikationen (Nahtbruch etc.)

GYNÄKOLOGIE:
postoperative Komplikationen in der Bauchhöhle und an den Adnexen (Uterusstumpfinsuffizienz, Myometritis),
primäre Krankheiten (Salpingitis, Adnexitis u. a.)

INNERE MEDIZIN:
Leberkrankheiten mit Insuffizienz der RES,
Colitis und Morbus Crohn,
Nierenkrankheiten,
Endokarditis (primär und sekundär),
erworbene Immunopathien (erworbene Leukosen, Hämoblastosen, Therapie mit Immunsuppressiver, konsumierende Erkrankungen)

PÄDIATRIE:
angeborene Immunopathien,
Enterocolitis im Neugeborenenalter (Peritonitis),
Blutkrankheiten (erworbene Immunopathien),

DERMATOLOGIE:
Furunkolose, Karbunkel, Pyodermien,
Durchblutungsstörungen mit Hautulzerationen

2 FRAGESTELLUNG

Obwohl die biologischen und chemischen Eigenschaften der Endotoxine in der letzten Zeit weitgehend bekannt geworden sind, ist der biologische Angriffspunkt des Endotoxins im Organismus noch relativ ungeklärt. Es stellt sich die Frage, wo und wie das Endotoxin den Organismus schädigt.
Über den Transportmechanismus, die Absorption und schließlich die Elimination und den Abbau liegen noch keine ausreichenden Informationen vor. So wird vermutet, daß die Endotoxine im Blut an die Thrombocyten gekoppelt werden, diese somit das "Carrier-System" darstellen (8).
Als Abfangort für Endotoxine sind die Zellen des RES bekannt, in erster Linie das RES der Leber, welches die erste große Barriere für Endotoxine, die aus dem Darmlumen resorbiert werden, darstellt (1). Nach Überschreiten der Leberbarriere kommen vor allem das RES von Lunge, Milz und Nieren in Frage. Genaue Untersuchungen hierüber liegen nicht vor, sie scheiterten bislang sämtlich an der Schwierigkeit, die äußerst geringen Mengen von Endotoxin mit einer empfindlichen Methode nachzuweisen. Da sich die krankheitsauslösenden Bakterien-Toxin-Mengen in Nano- oder Femtomolmengen (10^{-9}, 10^{-15}) bewegen, sind chemische Methoden meist zu ungenau und zu aufwendig, um in Lebend-Versuchen die jeweiligen Konzentrationen zu jedem Zeitpunkt zu erfassen. Es bietet sich aus diesen Gründen an, einen Tracer für die Bakteriensubstanz (Endotoxin) zu finden, der mit hoher Spezifität präzise Meßergebnisse liefert (Tab. 2).
Unter Berücksichtigung der in Tabelle 2 genannten Bedingungen wurde eine radioaktive Substanz als Tracer ausgewählt. Man verwendet dafür am Besten Gamma-Strahlen-emittierende Isotope wie ^{131}J und ^{125}J, da diese Isotopen gegenüber den sonst verwendeten Beta-Strahlen-emittierenden Isotopen ^{3}H und ^{14}C den Vorteil besitzen, einfach meßbar zu sein und eine wesentlich höhere spezifische Aktivität zu besitzen (3).

Tabelle 2: Anforderungen an einen Tracer

KEINE Veränderung des biologischen Verhaltens der markierten Substanz

STABILE Verbindung mit der zu markierenden Substanz

KEINE gravierenden Strukturänderungen des Moleküls durch die Markierung

KEINE Änderung der Abbaurate und Metabolisierung

UNKOMPLIZIERTE und billige Meßmethoden

KEINE Eigentoxizität der Markierungssubstanz

SIGNIFIKANTE Meßergebnisse

Beispiel: Mit einem Grammatom ^{125}J erhält man etwa 75mal so hohe Zählraten wie mit einem Grammatom ^{3}H und etwa 35000mal so hohe Zählraten wie mit einem Grammatom ^{14}C.

Nach diesen Vorüberlegungen stellt sich nun die Frage, ob sich das Endotoxin mit radioaktiven Jodisotopen markieren läßt und auf welche Weise.

Es stehen uns zwei verschiedene Endotoxine zur Verfügung. Das eine Endotoxin stammt von E.coli aus den USA (ohne Angaben über einen Reinheitsgrad) und das zweite Endotoxin von S.equi (aus dem Max-Planck-Institut in Freiburg, mit garantiertem Reinheitsgrad).

Es wurde nun versucht, eine von ULEVITCH 1977 veröffentlichte Markierungsweise (32) - anhand von E.coli - mit eigenen Methoden zu reproduzieren und nach genauer Kenntnis der chemischen Struktur des Endotoxins aus neuerer Zeit das Markierungsergebnis zu überprüfen und mit Hilfe von S.equi als Referenzsubstanz zu sichern.

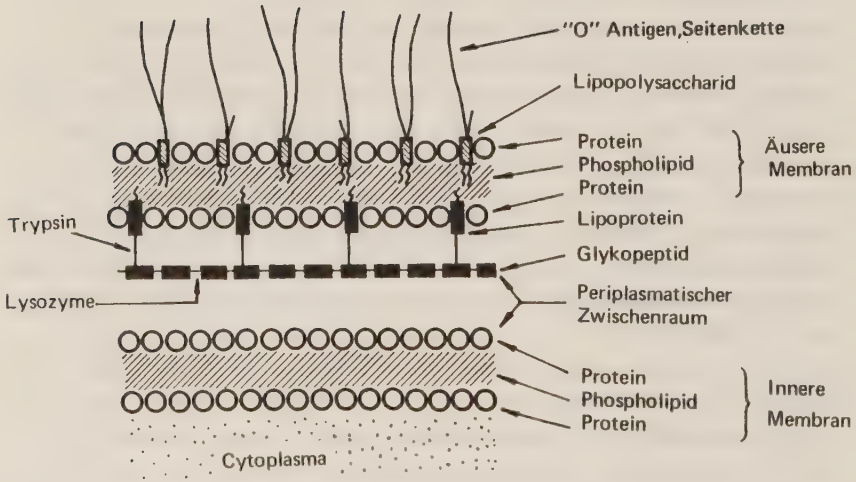
3 EIGENSCHAFTEN VON ENDOTOXINEN UND NACHWEISMETHODEN

3.1 Eigenschaften von Endotoxinen

3.1.1 Biologische Eigenschaften

Alle bislang untersuchten Gram-negativen Bakterien besitzen ein charakteristisches Merkmal. Sie bilden ein Lipopolysaccharid (LPS), ein makromolekulares Glykolipid (29), welches nach seiner Biosynthese (16) an die Zelloberfläche des Bakteriums transportiert wird und dort für die Vermehrung und die Vitalität verantwortlich ist. Es handelt sich dabei nicht um ein Exotoxin, also ein exogenes Produkt, welches zu Lebzeiten des Bakteriums an die Außenwelt gelangt, sondern um ein Endotoxin, ein Toxin also, das erst nach dem Tod und Lyse der Bakterienzelle frei wird und dann erst seine Toxizität entfaltet.
Zu Lebzeiten des Bakteriums bildet dieses Endotoxin (LPS) zusammen mit Protein und Phospholipiden die äußere Membran der bakteriellen Zelloberfläche. Diese äußere Membran ist eine Doppelmembran mit asymmetrischem Aufbau und ist wichtig für den Schutz der Bakterienzelle vor äußeren Einflüßen, wie Antibiotika oder Detergentien (21). Der äußere Anteil dieser Doppelmembran wird von dem Endotoxin und Proteinen gebildet, der innere dagegen besteht aus Phospholipiden, Proteinen und Lipoproteinen(Abb. 1).
Da die Endotoxine als Bestandteil des äußeren Doppelmembrananteils Oberflächenstrukturen sind, spielen sie für den Kontakt Gram-negativer Bakterien mit dem Immunsystem höherer Organismen eine große Rolle. Sie führen zur Bildung (29) antibakterieller Antikörper, die hauptsächlich gegen die LPS-Komponente gerichtet sind.
Das Endotoxin läßt sich noch weiter unterteilen: zunächst in einen Lipoid-Teil und in einen Polysaccharidanteil. Beide Teile lösen eine eigene Antikörperproduktion aus (2, 5) und wurden nach ihrer Entdeckung unterschiedlich benannt.

Abb. 1: Struktur der Zellwand Gram-negativer Bakterien (31)



Der Polysaccharidanteil wurde von WEIL und FELIX (1918), (33, 34), als O-Antigen bezeichnet. Den Lipoid-Teil benannten WESTPHAL und Lüderitz (1954), (35), als Lipoid-A. Sie entdeckten, daß dieses sogenannte Lipoid-A (21) allein für sämtliche, endotoxische Wirkungen im Körper verantwortlich ist. Das Polysaccharid besitzt dagegen keine endotoxischen Eigenschaften. Diese Entdeckung konnte später von zahlreichen Autoren bestätigt werden (KIM und Watson (20), 1967; LÜDERITZ et al. (24), 1966; GALANOS et al. (14), 1977).

Physiologischerweise befinden sich Gram-negative Bakterien in der Darmflora von Säugetieren und Menschen. Es gelangen ständig aus dem Darmlumen kleine Mengen von Endotoxinen in die systemische Zirkulation (15, 28). Dies kann auf zwei verschiedenen Wegen vorsichgehen:
1. über die mesenterialen Lymphbahnen, den Ductus thoracicus und den Sinus venosus in das Cavasystem (7);
2. durch die Darmwand über das Pfortaderblut durch die Leber in den großen Kreislauf (23).
Man nimmt an, daß diese kleinen Endotoxinmengen, die auf den beschriebenen Wegen in das zirkulierende Blut gelangen, für den Organismus nützlich sind, daß sie allgemein die Immunkräfte des Organismus stimulieren, indem die Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten zur Teilung angeregt werden (25). Neben der Erzeugung dieser unspezifischen Resistenz gegen Infektionen wirkt das Endotoxin als Adjuvant und induziert Tumornekrosen (16). Außerdem beobachtet man eine Komplementaktivierung (11, 13), die sehr früh eintritt und biologische Veränderungen, wie Granulozytose und Erhöhung der Glutamatpyruvat-transaminase-Aktivität im Plasma, nach sich zieht, bei der Erzeugung des Endotoxinschocks aber nur eine geringe Rolle spielt.
Neben den beschriebenen Eigenschaften ist das Endotoxin für eine Reihe - für die Klinik wichtiger - pathologischer Ereignisse im Organismus verantwortlich. Nach Injektion von Bakterien oder isoliertem Lipoid-A kommt es beim Versuchstier zu zahlreichen Sofortreaktionen (29), wie Fieber, Schock,

Verschiebung des Weißen Blutbildes, Nebennierenrindennekrosen, Blutdruckabfall und Shwartzman-Sanarelli-Phänomen mit oftmals anschließendem Tod (Tab. 3).
All diese Reaktionen sind die Symptome einer Infektion oder Sepsis mit Gram-negativen Bakterien beim Menschen. Demnach sind bakterielle Endotoxine ein starkes Gift für den menschlichen und tierischen Organismus und besitzen zu recht die Bezeichnung "Endotoxine".

Tabelle 3: Biologische Aktivitäten von freiem Lipoid-A (16)

FIEBERERZEUGUNG
TÖDLICHE Toxizität für Mäuse
LEUKOPENIE
LEUKOZYTOSE
LOKALE Shwartzman-Reaktion
KNOCHENMARKNEKROSE
EMBRYONALE Knochenresorption
KOMPLEMENTAKTIVIERUNG
BLUTDRUCKABFALL
THROMBOZYTENAGGREGATION
HAGEMANN-FAKTOR-AKTIVIERUNG
INDUZIERUNG von Plasminogen-Aktivator
LIMULUS-LYSAT-GELATION
VERSTÄRKUNG der Toxizität durch BCG
VERSTÄRKUNG der Toxizität durch Adrenalektomie
VERSTÄRKUNG der Hautreaktion gegenüber Epinephrin
INDUZIERUNG von unspezifischen Widerstand gegenüber Infektionen
INDUZIERUNG von Endotoxin-Toleranz
INDUZIERUNG eines frühen reaktionslosen Zustandes gegenüber Temperaturänderungen
ADJUVANT-AKTIVIERUNG
MAKROPHAGEN-AKTIVITÄT
AKTIVIERUNG von Zellmitosen
AKTIVIERUNG von Tumornekrosen
INDUZIERUNG von IgG-Synthese bei neugeborenen Mäusen
INDUZIERUNG von Prostaglandin-Synthese
INDUZIERUNG eines tumornekrotisierenden Faktors
INDUZIERUNG von Mäuseleber-Pyruvatkinase
FREISETZUNG von Typ-C-RNA-Virus aus Mäusemilzzellen
HEMMUNG der Phosphorenolpyruvat-Carboxykinase
HYPOTHERMIE bei Mäusen

3.1.2 Chemische Eigenschaften

Die vielfältigen endotoxischen Wirkungen und die damit verbundene Bedeutung für die Klinik forcierten die Analyse der chemischen Struktur des Endotoxins. Im Jahre 1960 postulierte LÜDERITZ (25a), daß alle bekannten Endotoxine Gram-negativer Bakterien ein gemeinsames Strukturprinzip besitzen (29). Dieses Ergebnis wurde durch Vergleiche chemischer Analysen von Endotoxinen aus verschiedenen Salmonella-Spezies und Escherichia-Spezies gesichert.
Das gemeinsame Strukturprinzip der Endotoxine besteht aus einer Polysaccharidkomponente und aus einem Lipoid-Teil (16, 21, 25, 29), dem Lipoid-A. Die Polysaccharidkomponente läßt sich weiter in eine O-spezifische Kette und in ein Kernoligosaccharid aufteilen (Abb. 2). Insgesamt erhält man drei Regionen, die unterschiedlich aufgebaut sind, unterschiedliche Funktionen besitzen und unter unterschiedlicher genetischer Kontrolle stehen.

DIE O-SPEZIFISCHE KETTE (I REGION)

Die O-spezifische Kette konnte noch weiter analysiert werden (Abb. 3). Sie besteht aus (16, 21, 25, 29) sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten, welche man "repeating units" nennt. Das viel verwendete Beispiel hierfür ist die O-spezifische Kette von Salmonella typhimurium. Man findet charakteristischerweise einen Aufbau aus sich wiederholenden Untereinheiten identischer Oligosaccharide. Meistens sind es etwa 8 Wiederholungseinheiten, im Fall des Salmonella typhimurium findet man ein verzweigtes Pentasaccharid.
Auch die Struktur einer Wiederholungseinheit läßt sich weiter aufgliedern. Bei unserem Beispiel besteht eine Wiederholungseinheit aus einem linearen Trisaccharid. Dieses Trisaccharid setzt sich aus folgenden Sacchariden zusammen: D-Mannose, L-Rhamnose und D-Galaktose. Die D-Galaktose besitzt zwei Substituenten, 2-O-Acetyl-Abequose und D-Glucose.

Abb. 2 (29):

BAUPRINZIP VON LIPOPOLYSACCHARID

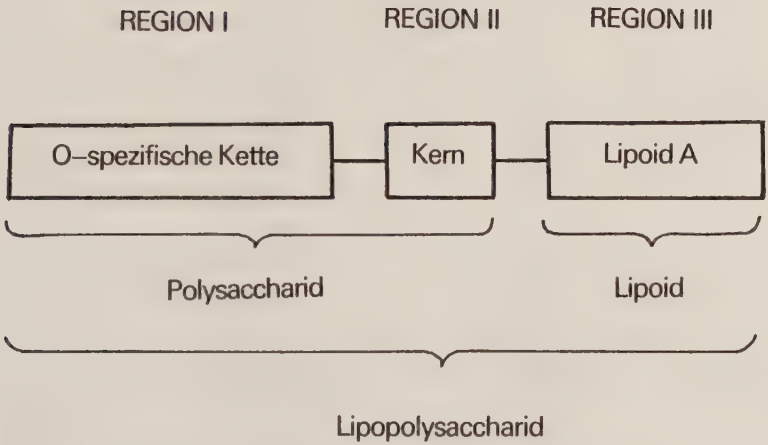
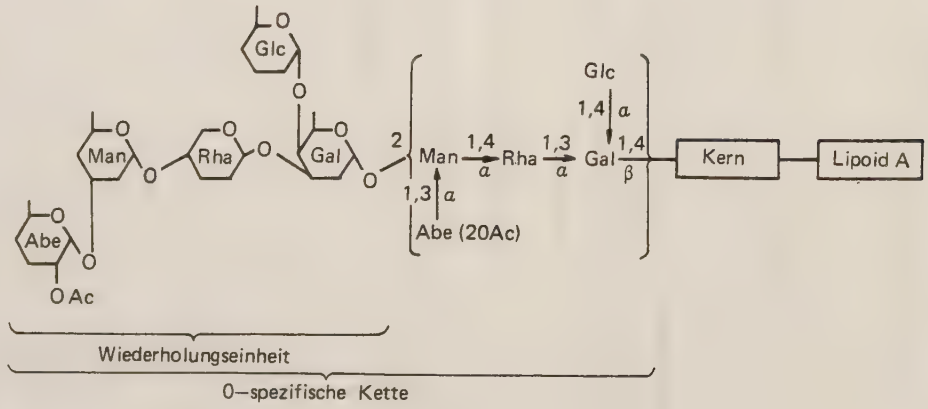


Abb. 3 (29):

STRUKTUR DER O-SPEZIFISCHEN KETTE (REGION I)
VON SALMONELLA TYPHIMURIUM (O-FAKTOREN 4,5,12)

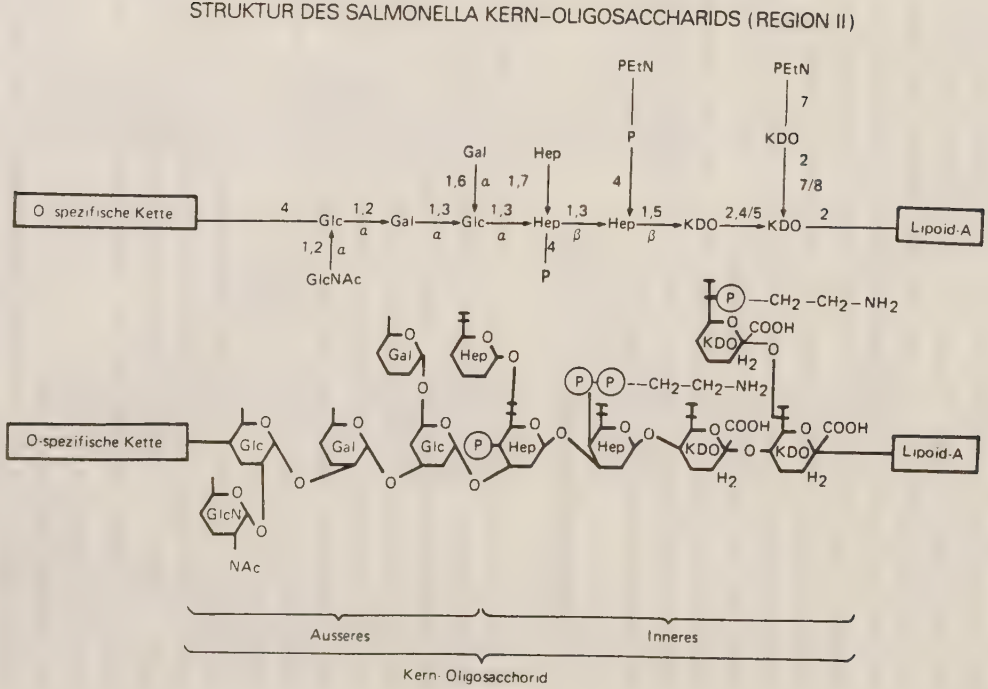


Für jede der heute über 1000 bekannten Salmonella-Spezies ist diese Wiederholungseinheit einzigartig aufgebaut. Sie ist somit speziesspezifisch und für die Bildung spezifischer Antikörper bei Infektionen eines Organismus verantwortlich. Für das Bakterium selbst hat die O-spezifische Kette auch noch zahlreiche Bedeutungen. Sie verleiht der äußeren Zellwand des Bakteriums eine große Festigkeit und spielt außerdem bei der Antibiotika-Resistenz eine große Rolle. Durch Erhöhung der Hydrophilie der Membran verhindert die O-spezifische Kette, daß hydrophobe Substanzen, wie die Antibiotika Actinomycin D, Rifamycin und Farbstoffe der Gram-Färbung, in das Bakterium eindringen.
Weiterhin können die Bakterien nur dann vom Wirtsorganismus phagocytiert werden, wenn dieser spezifische Antikörper gegen die O-spezifische Kette besitzt.

DAS KERNOLIGOSACCHARID (II REGION)

An die O-spezifische Kette (29) findet man kovalent das Kernoligosaccharid gebunden vor. Es stellt die Region II dar und ist im Gegensatz zu der O-spezifischen Kette wesentlich weniger variabel. Als Beispiel wird auch hier wieder die Struktur von Salmonella typhimurium verwendet. Man findet ein Undecasaccharid, welches aus einer Kette besteht. In dieser Kette besitzt fast jeder zweite Zuckerrest einen Substituenten.
Das Undecasaccharid (Kernoligosaccharid) läßt sich weiter in einen äußeren und einen inneren Bereich aufteilen. Der äußere Bereich wird aus einem Pentasaccharid gebildet, welches aus Glukose (Glc), Galaktose (Gal) und N-Acetylglucosamin (GlcN) aufgebaut ist (Abb. 4).
Der innere Kern ist aus L-Glycero-D-manno-Heptose, Desoxyoktulonsäure (dOclA, frühere Bezeichnung KDO) und Phosphat zusammengesetzt. Man findet die dOclA und die Heptose als verzweigte Trisaccharide vor.

Abb. 4 (29): Struktur des Salmonella Kern-Oligosaccharid (Region II)



Diese Trisaccharide sind mit Phosphat, Phosphoräthanolamin und Pyrophosphoräthanolamin substituiert. Insgesamt läßt sich sagen, daß der innere Kern im Gegensatz zu dem äußeren durch eine Anhäufung von ionischen Gruppen geladen ist.

LIPOID-A (III REGION)

Über die dOclA ist das Kern-Oligosaccharid kovalent an das Lipoid-A gebunden. Dieses Lipoid-A, Region III des Lipopolysaccharid-Moleküls, ist für alle endotoxischen Eigenschaften des Endotoxins verantwortlich. Wenn man von Endotoxinen spricht, meint man somit diesen Lipoid-Teil.
Bei der Untersuchung der Lipoid-A-Struktur wurde für alle Enterobacteriaceae und viele andere Gram-negative Keime eine gemeinsame Grundstruktur entdeckt (29, Abb. 5).
Es handelt sich um den am wenigsten variablen Anteil des Endotoxins. Die Grundstruktur des Lipoid-A (wieder als Beispiel Salmonella typhimurium) besteht aus einem Glucosamindisaccharid, dessen beide Glucosaminreste ß 1,6 verknüpft sind und an dessen 1- und 4'-C-Atomen Phosphatreste hängen. Diese Phosphatreste sind nicht die einzigen Substituenten. Man findet die Phosphatgruppe in Position 4' zum Teil durch L-4-Aminoarabinose, und die Phosphatgruppe in Position 1, teilweise durch Phosphoryläthanol, substituiert.
Die Aminogruppen sind mit D-3-Hydroxy-myristinsäureresten und die übrigen Hydroxylgruppen an den Positionen 3, 4 und 6' mit langkettigen Fettsäuren, wie Laurin-, Myristin- und Palmitinsäureresten substituiert.
Über die dOclA am C-Atom 3' findet das Lipoid-A zum übrigen Polysaccharid durch eine ketosidische Bindung Anschluß.
Diese hier beschriebene gemeinsame Grundstruktur zeigt eine gewisse Variabilität in der Natur der Substituenten und dem Grad der Substitution an den Phosphatresten bei den verschiedenen Bakterien-Spezies (Abb. 6). Das Phosphat kann durch Pyrophosphat, Äthanolaminpyrophosphat, Glucosylphosphat und 4-Amino-arabinosephosphat ersetzt sein.

Abb. 5 (29):

STRUKTUR VON SALMONELLA LIPOID A

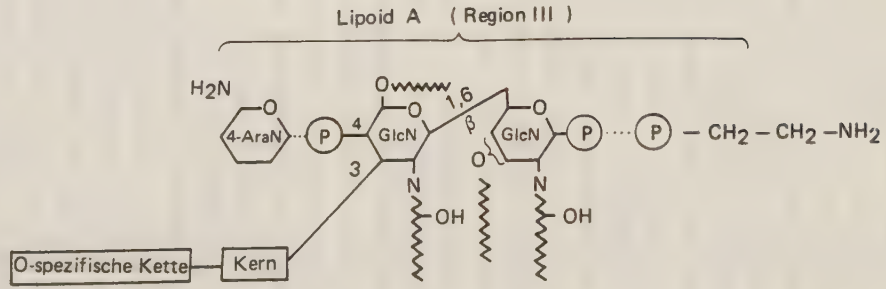
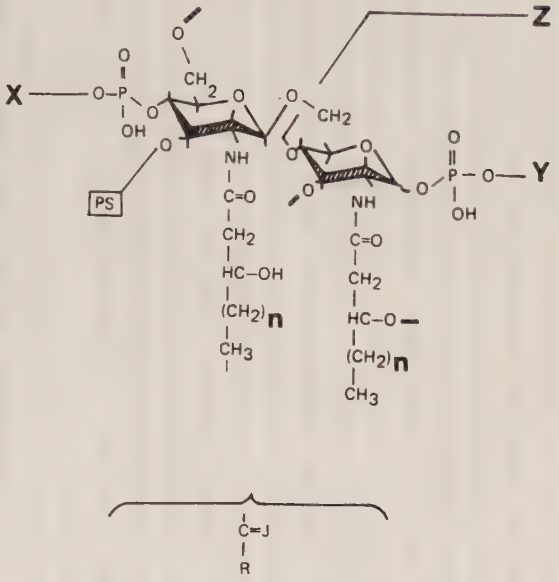


Abb. 6 (29): Chemische Struktur des Lipoid-A



X	Y	Z	n	
H	P	COR	10	Escherichia coli
4- AraN	H	COR	10	Proteus mirabilis
4- AraN	PEtN	COR	10	Salmonella spp
4- AraN	GlcN	COR	8	Chromobacterium violaceum
4- AraN	Ara(f)	GlcN	6	Rhodospirillum tenue

Das Fettsäure-tragende phosphorylierte Disaccharid hingegen stellt ein konstantes Strukturelement dar. Die dort gebundenen Fettsäuren sind essentiell für die endotoxische Aktivität, da das Endotoxin-Molekül nach Abtrennung der Fettsäuren keine biologischen Aktivitäten mehr zeigt.

3.2 Nachweismethoden

3.2.1 Limulus-Test-Methode (Limulus Amöbocytenlysat, L.A.T.-Test)

Durch einen Zufall fand man durch eine Krankheit bei Pfeilschwanzkrebsen (Limulus polyphemus) 1956, die zu einer totalen intravasalen Koagulation mit Todesfolge führt, einen Zusammenhang mit Endotoxinen, der für den Verlauf der Krankheit entscheidend war. Man entdeckte, daß die intravasale Koagulation durch eine enzymatische Reaktion verursacht wurde, die in Gegenwart von Endotoxinen und aggregierbaren Proteinen aus den einzigen Blutzellen des Pfeilschwanzkrebses (Amöbocyten), in Gang kam (5, 6).
Diese Entdeckung setzte den Grundstein für weitere Versuche, Endotoxine in biologischen Flüssigkeiten, wie Blut, Plasma, Serum, Urin und Liquor, mit Hilfe von Limulus Amöbocyten nachzuweisen. Es wurde von der Firma BYK-MALLINCKRODT ein Substrat "Pyrogent" entwickelt, welches zum Nachweis von Endotoxinen Gram-negativer Bakterien (Pyrogen) in wässrigen Lösungen standardmäßig verwendet werden kann. Dieses Pyrogent wird nach Lyse von Amöbocyten des Pfeilschwanzkrebses aus den löslichen Bestandteilen hergestellt und bildet bei Anwesenheit von Endotoxinen ein festes Gel, welches nach Drehung des Reagenzgläschens haften bleibt und so eindeutig eine positive Reaktion (nur bei genauer Befolgung der Gebrauchsanweisung) dokumentiert.
Der dabei ablaufende Reaktionsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgedeckt worden. Man vermutet, daß ein Proclotting-Enzym in Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen durch Endotoxin aktiviert

wird und anschließend die hydrolytische Spaltung eines Coagulogen bzw. Agglutinins (aggregierbares Protein) zu Polypeptidketten katalysiert. Nach einer weiteren enzymatischen Abspaltung eines löslichen Peptids verbleibt ein unlösliches Peptid (Coagulin), welches zu einem stabilen Gel polymerisiert (Indikator für die Anwesenheit von Endotoxinen) (Tab. 4).

Tabelle 4: Störfaktoren des L.A.L.-Test (BYK-MALLINCKRODT, Pyrogent, Gebrauchsinformation, S. 15)

FÜR FALSCH POSITIVE ERGEBNISSE URSÄCHLICHE FAKTOREN
Trypsin und Proteasen mit ähnlicher enzymatischer Wirkung
Rinderthrombin
Polynukleotide
Thromboplastin
ß-Lactamasen
Peptidglycan
FÜR FALSCH NEGATIVE ERGEBNISSE URSÄCHLICHE FAKTOREN
Alle proteindenaturierende Substanzen
Ca^{2+}-Ionen > 0,62 mg/ml
Sehr hohe Elektrolyt-Konzentrationen
Blut-, Plasma- und Serumproben
Extrem hohe Endotoxin-Konzentrationen u. a.

Bevor ein Produkt routinemäßig mit L.A.L.-Test auf Endotoxine geprüft wird, sollte es auf mögliche Störfaktoren untersucht werden.

3.3 Darstellung möglicher Markierungsverfahren

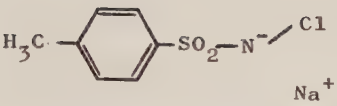
3.3.1 Methode nach Greenwood und Hunter

Neben chemischen Nachweismethoden werden heute in der Forschung oft Markierungsverfahren von organischen Substanzen mit Hilfe von radioaktiven Isotopen durchgeführt. Es werden hier im Speziellen nur zwei Beispiele genannt. Das erste Beispiel wurde von GREENWOOD und Mitarbeitern (17, 19) entwickelt. Es handelt sich hierbei um eine Methode, die zur schonenden Markierung kleiner Proteinmengen mit radioaktiven Jodisotopen dient. Dabei wird das freie Jod direkt in das Protein eingebaut (direkte Markierungsmethode) und nicht wie bei der Bolton-Hunter-Konjugationsmethode indirekt mittels eines radioaktiv markierten Moleküls an das Protein gekoppelt (konjugiert).

BESCHREIBUNG DER METHODE

In einem möglichst kleinvolumigen Markierungsansatz wird das Jodidnukleotid (Natrium-125-Jodid) in Anwesenheit des zu markierenden Proteins durch Chloramin T zu kationischem Jod (J^+) oxidiert (3, 26). Dieses kationische Jod substituiert nun an Tyrosylresten des hinzugefügten Proteins H-Atome. Anschließend werden durch die Zugabe von Natriummetabisulfit das überschüssige Chloramin T und das freie Jod reduziert und die Reaktion somit beendet (Abb. 7a). Danach trennt man das markierte Protein vom freien Jod und anderen niedermolekularen Reaktionsprodukten unter Zugabe eines Puffers durch Gelfiltration mit Sephadex (Tab. 5). Während der Trennung wird durch einen Fraktionssammler kontinuierlich das erhaltene Produkt in 50 Röhrchen gesammelt. Man kann nach Beendigung der Trennung die einzelnen Fraktionen der Reihe nach im Bohrlochzählgerät auf ihre Radioaktivität hin messen und erhält bestenfalls ein Elutionsdiagramm, wie in Abb. 7.

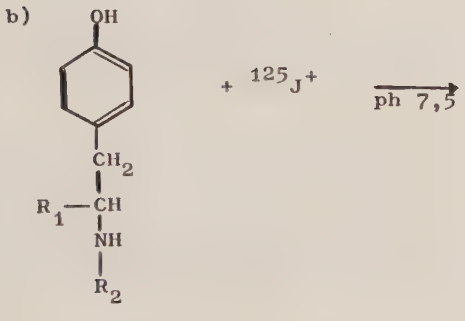
Abb. 7a (17): Reaktionsschritte der Methode nach Greenwood und Hunter



Chloramin T (N-chlor-p-toluolsulfonsäureamid-Natrium)

a) $2\ {}^{125}J^- \xrightarrow{\text{Chloramin T}} {}^{125}J_2 \longrightarrow {}^{125}J^+ + {}^{125}J^-$

b)



Thyrosin-Rest

2-Jodthyrosyl-Derivat (markiertes Protein)

Der erste in Abb. 7 sichtbare Peak entspricht dem markierten Protein. Es verläßt aufgrund seiner hohen Molekulargröße die Trennsäule zuerst. Das viel kleinere Jod-Molekül folgt zusammen mit Chloramin T und anderen niedermolekularen Degradationsprodukten zum Schluß und bildet so den zweiten in Abb. 7 sichtbaren Peak.
Im Idealfall sollte der erste Peak größer als der zweite und eindeutig vom ersten Peak getrennt sein.

Abb. 7: Elutionsdiagramm einer optimalen Markierung nach der Greenwood-Hunter-Methode

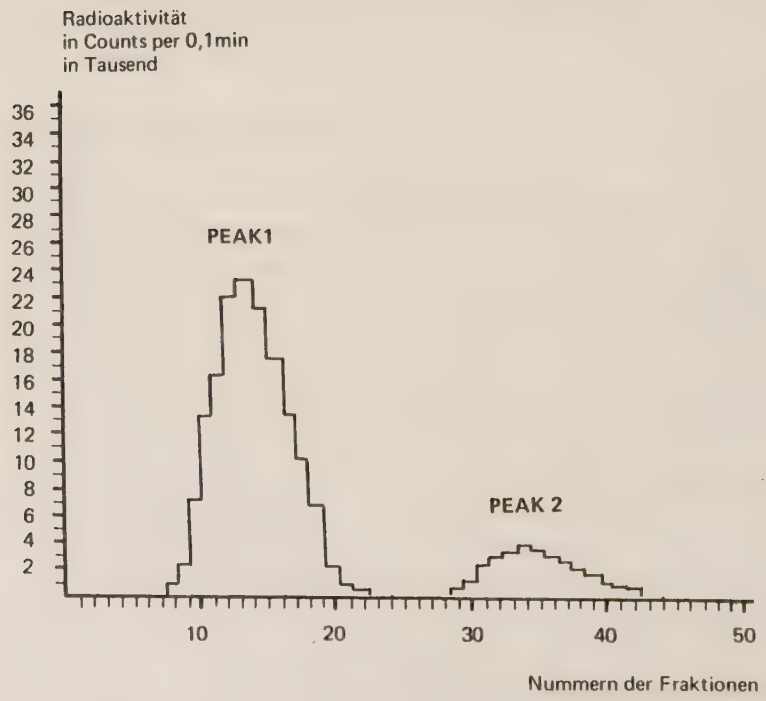


Tabelle 5: Fehlerquellen bei der Markierung

DAS ph-Optimum der Chloramin T-Methode liegt bei ph 7,5. Man erhält eine deutliche Verminderung der Markierungsausbeute wenn die ph-Werte < ph 6,5 und > ph 8,5 sind.

ES sollten nur kleine Proteinmengen (2 - 5 µg) eingesetzt werden und die Volumina aller Reagenzien so klein wie möglich gehalten werden, um hohe Konzentrationen der eingesetzten Reaktionspartner zu erreichen (Voraussetzung für eine optimale Ausbeute). Außerdem kann es durch direkten Kontakt von Chloramin T und durch hohe Konzentrationen von atomarem Jod zu Änderungen der Tertiär- und Sekundärstruktur des Proteins kommen, daß Oxydation von Sulfhydrylgruppen bzw. oxidative Sprengung von Disulfidbrücken die ursprüngliche Struktur verändern. Die Folge wäre eine Änderung des biologischen, immunologischen, elektrophoretischen und sedimentativen Verhaltens. Aus diesem Grund sollte außer den Volumina auch die Reaktionszeit vermindert werden.

ERHÄLT man bei der Auswertung der Markierung statt zwei eindeutigen Peaks viele kleine Peaks, spricht dies für einen Zerfall des Proteins mit Markierung der entstandenen Bruchstücke. Ein Ergebnis dieser Art wäre unbrauchbar.

3.3.2 Methode nach Bolton und Hunter

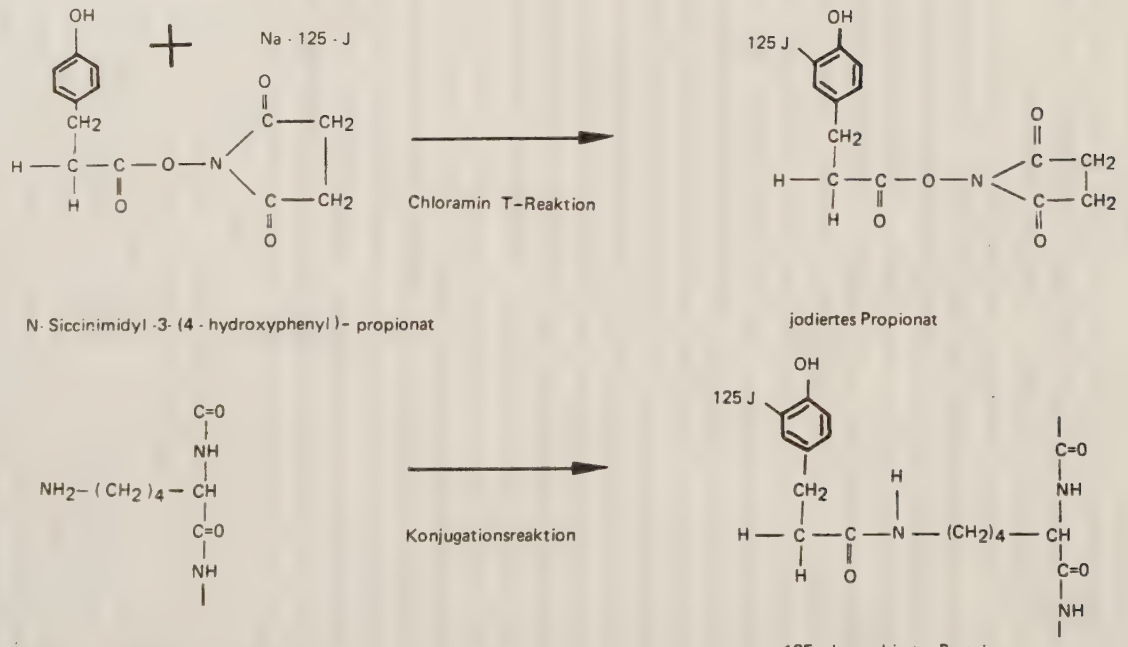
BOLTON und Hunter haben 1973 eine Methode entwickelt, ein Protein indirekt durch Konjugation radioaktiv zu markieren (2). Diese Konjugationsmethode ist wesentlich komplexer als die direkte Markierungsmethode (Greenwood-Hunter). Es muß zunächst ein Molekül mit Jod radioaktiv markiert werden, dann gereinigt und zum Schluß an das Protein gekoppelt (konjugiert) werden. Das Hauptprinzip der Konjugation beruht auf Reaktionen an Aminogruppen in Seitenketten von Proteinen, vor allem N-terminalen Aminogruppen und Lysinresten.
Diese nach Bolton und Hunter benannte Konjugationsmethode (3) eignet sich besonders gut für Moleküle, die keine Tyrosinreste enthalten oder deren enzymatische oder biologische Aktivität durch die direkte Markierung mit J-125 verloren gehen würde. Außerdem ist die Bolton-Hunter-Methode eine wesentlich mildere chemische Reaktion, so daß Denaturierung oder Abbau der Proteine weitgehend vermieden werden kann. Durch Kopplung des radioaktiv markierten Moleküls außerhalb der Peptidkette kann eine Zerstörung des Proteins durch Radiolyse verhindert werden (10).
Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Konjugationsmethode besteht darin, daß man die spezifische Aktivität der Markierung erhöhen kann, ohne deswegen mehr Moleküle an das Protein binden zu müssen. Dies geschieht durch mehrfachen Einbau von Jod-Atomen in ein und dasselbe Molekül (Abb. 8).
Als zu markierendes Molekül wurde N-Succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat (NSHPP) gewählt (30). Dieses NSHPP wird zuerst nach der Greenwood-Hunter-Methode jodiert. Da die markierte Substanz in wässriger Lösung sehr schnell zu 3-(4-hydroxyphenyl)propionsäure hydrolisiert, muß die Jodierungsreaktion schnell durchgeführt werden und mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden. Nach Abdampfen des organischen Lösungsmittels mit Stickstoff kann die markierte Verbindung entweder sofort für die nachfolgenden Reaktionen eingesetzt werden, oder sofort durch Dünnschichtchromatogra-

phie in mono- und dijodierte Verbindungen getrennt werden. Eine Alternative bietet das von AMERSHAM BUCHLER angebotene Bolton-Hunter-Reagenz. Dieses Reagenz stellt das Endprodukt der eben beschriebenen Reaktionsschritte dar und kann sofort für die Folgereaktionen verwendet werden.

Für die Bolton-Hunter-Reaktion muß das zu markierende Protein in einem möglichst kleinen Volumen gelöst sein, da die Ausbeutungsrate von der Konzentration der eingesetzten Reagenzien (4) abhängig ist (es gelten annähernd gleiche Fehlermöglichkeiten wie bei der Greenwood-Hunter-Methode, Tab. 5). Man verwendet deshalb 5μg Protein, in 10μl 0,1m Boratpuffer gelöst, ph 8,4 und setzt pro Mol Protein 3-5 Mol Bolton-Hunter-Reagenz ein. Dann läßt man die Lösung für 15 bis 30 min im Eiswasserbad und bindet anschließend das nicht verbrauchte Reagenz an einen Überschuß von Glycin (Abb. 17). Durch Gelfiltration mit einem Puffer unter Zusatz von 0,2 % Gelatine kann man danach das markierte Protein von den anderen Reaktionsprodukten, wie jodierte 3-(4-hydroxyphenyl)-propionsäure abtrennen. Der Zusatz von 0,2 % Gelatine als Träger ist notwendig, um Absorptionsverluste während der Trennung zu vermindern (Hydroxyphenylpropionsäure bindet an andere Träger, aber nicht an Gelatine).

An die Gelsäule (Sephadex) wird ein Fraktionssammler mit 50 Röhrchen angeschlossen, der während der Trennung die einzelnen Fraktionen auffängt. Die einzelnen Reaktionsvolumina werden mit 0,05 ml Phosphatpuffer 0,05m aufgefüllt und können dann auf die Radioaktivität hin gemessen werden.

Abb. 8 (3): Reaktionsschritte der Bolton-Hunter-Konjugations-
methode (S. 38)



4 MARKIERUNGSDURCHFÜHRUNG

4.1 Greenwood-Hunter-Methode

4.1.1 Material und Geräte (Arbeitsanweisung nach Dr. H. Meinhold, Nuklearmedizin, FU-Berlin)

4.1.1.1 Material

HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

Phosphatpuffer 0,5m ph 7,5

a) NaH_2PO_4 x 1 H_2O 13,8 g/ 200 ml H_2O bidest.

b) Na_2HPO_4 x 1 H_2O 179,2 g/1000 ml H_2O bidest.

Mischen: 164 ml a) und 836 ml b), ph kontrollieren.

Phosphatpuffer 0,01m ph 7,8

10 ml Phosphatpuffer 0,5m mit 490 ml H_2O bidest. verdünnen, durch Zutropfen von 1m NaOH auf ph 7,8 einstellen, 9 g 0,9 % NaCl pro 1 l Puffer zugeben.

Phosphatpuffer 0,05m

100 ml Phosphatpuffer 0,5m mit 900 ml H_2O bidest. verdünnen, ph kontrollieren.

HERSTELLUNG DER SÄULE

Sephadex G 75

Partikelgröße: 40-120 µ

4 g Sephadex G 75 in 100 ml Phosphatpuffer 0,01m suspendieren, 20 mg Natriumazid zugeben (0,02 %). 15 Std bei 4° C mit Magnetrührer quellen lassen. Sephadex G 75-Suspension auf Raumtemperatur bringen und in eine Glassäule (Ø 1 cm) füllen, Füllhöhe 18 cm. Säule mit 50 ml 0,01m Phosphatpuffer spülen, 1 ml 2 %iger Rinderalbumin-Lösung (BSA) (80 mg BSA in 4 ml Phosphatpuffer 0,01m lösen) auf die Säule geben, mit 60 ml

Phosphatpuffer 0,01m spülen. Pufferüberstand auf der Säule belassen, um Austrocknung zu verhindern.

REAGENZIEN

Chloramin T (CAT)
5 mg Chloramin T /2 ml 0,01m Phosphatpuffer

Natriummetabisulfit($Na_2S_2O_5$)
6 mg $Na_2S_2O_5$ /2 ml 0,01m Phosphatpuffer (beide Substanzen erst unmittelbar vor Markierungsdurchführung lösen).

Na-125-Jod
Natriumjodid-125-J zur Proteinmarkierung (Fa. AMERSHAM BUCHLER)

Endotoxin
a) E.coli 026:B_6 Control 558188
Lipopolysaccharide B 3929-25 Bacto

b) S.equi Freiburg, Prof. Dr. LÜDERITZ, Dr. Galanos

4.1.1.2 GERÄTE

Fraktionssammler
"LKB Ultroba C, Fraction Collector" der Firma LKB PRODUKTER AB, Stockholm-Bromma 1, Sweden.
50 Zentrifugengläser numerieren, in Fraktionssammler stellen.
Einstellung des Fraktionssammlers:
8 Tropfen / Fraktion (≙ ca. 0,5 ml)
5 Racks (≙ 50 Gläsern)

Wirlimixer

Bohrlochzähler
NaJ (TL)-Bohrlochszintillationsdetektor in Verbindung mit

einem elektronischen Meßplatz.

Markierungsgefäß mit Deckel
Glasgefäß mit konischem Boden und Schraubdeckel

Das Markierungsverfahren und das Trennungsverfahren müssen unter dem Abzug durchgeführt werden.

4.1.2 Durchführung

20 µl 0,5m Phosphatpuffer werden zusammen mit 10 µl Endotoxin und 10 µl Jod-125 in das Markierungsgefäß pipettiert. Nach einer weiteren Zugabe von 10 µl CAT und Beendigung der Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zugabe von 20 µl $Na_2S_2O_5$ beendet. Nach Aufgabe des Markierungsgemisches auf die Sephadex-Säule wird der Fraktionssammler angestellt (8 Tropfen / 5 Racks) und nach einer Laufzeit von ca. 1 1/2 Std können die 50 Fraktionen am Bohrlochzähler gemessen werden. Für die Berechnung der prozentualen Meßergebnisse werden dann alle Counts > 1000 verwendet und die Summe aller Counts gleich 100 % gestellt. Den prozentualen Anteil der Markierungsausbeute erhält man dann, indem die Summe aller Counts der Fraktionen des ersten Peaks zu allen Counts ins Verhältnis gesetzt wird.

4.1.3 Versuchsbedingungen

Es mußten zuerst die optimalen Versuchsbedingungen für eine maximale Markierungsausbeute gefunden werden. Aus diesem Grund wurde zuerst eine Versuchsserie mit E.coli durchgeführt. Dabei wurden die einzelnen Parameter wie folgt modifiziert:

Versuch Nr. I:
10 µl J-125 ≙ ca. 1 mCi
20 µl E.coli 0,5 mg/ml 0,9 % NaCl ≙ 10 µg/ 20 µl

10 µl CAT 2,5 mg/ml 0,01m P.Puffer ≙ 25 µg/ 10 µl
20 µl $Na_2S_2O_5$ 3 mg/ml 0,01m P.Puffer ≙ 60 µg/ 20 µl
Inkubationszeit: 30 sec

Versuch Nr. II:
10 µl J-125 ≙ 1 mCi
20 µl E.coli 5 mg/ml 0,9 % NaCl ≙ 100 µg/ 20 µl
10 µl CAT 2,5 mg/ml 0,01m P.Puffer ≙ 25 µg/ 10 µl
20 µl $Na_2S_2O_5$ 3 mg/ml 0,01m P.Puffer ≙ 60 µg/ 20 µl
Inkubationszeit: 30 sec
Gegenüber Versuch Nr. I wurde die Konzentration von E.coli verzehnfacht.

Versuch Nr. III:
10 µl J-125 ≙ 1 mCi
20 µl E.coli 5 mg/ml 0,9 % NaCl ≙ 100 µg/ 20 µl
10 µl CAT 5 mg/ml 0,01m P.Puffer ≙ 50 µg/ 10 µl
20 µl $Na_2S_2O_5$ 6 mg/ml 0,01m P.Puffer ≙ 120 µg/ 20 µl
Inkubationszeit: 30 sec
Gegenüber Versuch Nr. II wurde die Konzentration von CAT und $Na_2S_2O_5$ verdoppelt.

Versuch Nr. IV:
10 µl J-125 ≙ 1 mCi
20 µl E.coli 5 mg/ml 0,9 % NaCl ≙ 100 µg/ 20 µl
10 µl CAT 5 mg/ml 0,01m P.Puffer ≙ 50 µg/ 10 µl
20 µl $Na_2S_2O_5$ 6 mg/ml 0,01m P.Puffer ≙ 120 µg/ 20 µl
Inkubationszeit: 45 sec
Die gleichen Bedingungen wie bei Versuch Nr. III, nur mit Erhöhung der Inkubationszeit um 15 sec.

Versuch Nr. V:
wie Versuch Nr. IV, nur mit einer Inkubationszeit von 15 sec. Es herrschen somit die gleichen Bedingungen wie bei Versuch Nr. IV, nur mit einer Senkung der Inkubationszeit auf 15 sec.

Versuch Nr. VI:

10 µl J-125			≙	1 mCi
20 µl E.coli	2,5	mg/ml 0,9 % NaCl	≙	50 µg/ 20 µl
10 µl CAT	5	mg/ml 0,01m P.Puffer	≙	50 µg/ 10 µl
20 µl $Na_2S_2O_5$	6	mg/ml 0,01m P.Puffer	≙	120 µg/ 20 µl

Inkubationszeit: 30 sec

Gegenüber Versuch Nr. III wurde jetzt die Konzentration von E.coli halbiert.

Die Versuche wurden pro Versuchsanordnung doppelt durchgeführt. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Vergleichend zu der E.coli-Markierung wurde eine Versuchsserie mit S.equi durchgeführt. Da die besten Markierungsergebnisse mit der Versuchsanordnung von Versuch Nr. III erzielt wurden, begann die neue Versuchsserie von S.equi mit den gleichen Bedingungen wie Versuch Nr. III.

Versuch Nr. VII:
wie Versuch Nr. III

Versuch Nr. VIII:
wie Versuch Nr. IV

Nachdem kein Markierungsergebnis erzielt werden konnte, das über 0,5 % Ausbeute ging, wurde eine neue Versuchsanordnung mit maximaler Konzentration der Versuchsvolumina geschaffen.

Versuch Nr. IX:

10 µl J-125			≙	1 mCi
20 µl S.equi	2,5	mg/ml 0,9 % NaCl	≙	50 µg/ 20 µl
10 µl CAT	25	mg/ml 0,01m P.Puffer	≙	250 µg/ 10 µl
20 µl $Na_2S_2O_5$	30	mg/ml 0,01m P.Puffer	≙	600 µg/ 20 µl

Inkubationszeit: 60 sec

Gegenüber dem Versuch Nr. III wurden die Konzentrationen von CAT und $Na_2S_2O_5$ auf das Fünfzigfache und die Inkubationszeit auf 60 sec gesteigert.

4.1.4 Ergebnisse

Unter Veränderung der einzelnen Parameter, wie Konzentration der zu markierenden Substanz, des Gesamtvolumens (Volumina der einzelnen Reaktionssubstanzen) und der Inkubationszeit, wurde versucht, die Markierungsausbeute zu optimieren. Dabei wurde das Verhältnis von freiem und gebundenen Jod in Richtung des gebundenen Jods verschoben.
Unter den Markierungsbedingungen 10 µl J-125, 20 µl E.coli 5 mg/ml, 10 µl CAT 5 mg/ml, 20 µl $Na_2S_2O_5$ 6 mg/ml und einer Inkubationszeit von 30 sec konnte die optimale Ausbeute von 44,99 % (Versuch Nr. III, Abb. 11) erzielt werden.
Die anderen verwendeten Markierungsbedingungen (Versuch Nr. II: zehnfache Konzentration von E.coli; Versuch Nr. IV: wie Versuch Nr. III nur mit Erhöhung der Inkubationszeit um 15 sec; Versuch Nr. V: wie Versuch Nr. III, nur mit Senkung der Inkubationszeit auf 15 sec) brachten eine geringere Ausbeute (Tab. 6). Bei Versuch Nr. I konnte eine Ausbeute von 6,764 % (Abb. 9), bei Versuch Nr. II eine Ausbeute von 21 % (Abb. 10), bei Versuch Nr. IV eine Ausbeute von 35,24 % (Abb. 12), bei Versuch Nr. V eine Ausbeute von 21,60 % (Abb. 13) und bei Versuch Nr. VI eine Ausbeute von 23 % (Abb. 14) erzielt werden.
Als nun versucht wurde, das mit Versuch Nr. III bei E.coli erzielte optimierte Markierungsergebnis mit S.equi zu reproduzieren, erreichte man bei gleichen Versuchsbedingungen (Versuch Nr. VII, Versuch Nr. VIII (Abb. 15)) kein Ergebnis über 0 % Markierungsausbeute. Auch unter maximaler Konzentrierung der eingesetzten Substanzen wie 10 µl J-125, 20 µl S.equi 2,5 mg/ml, 10 µl CAT 25 mg/ml, 20 µl $Na_2S_2O_5$ 30 mg/ml und einer Inkubationszeit von 60 sec konnte nur eine minimale Markierungsausbeute von 3,06 % (Abb. 16) erzielt werden. Da diese Markierungsausbeute in so geringem Maße und nur unter schärfsten Versuchsbedingungen erzielt werden konnte, wurde konsterniert, daß die Markierungsmethode nach Greenwood-Hunter bei S.equi nicht zu reproduzieren ist.

Tabelle 6: Veränderungen der Versuchsparameter und die daraus resultierende Ausbeute

Versuche (Abb.)	J-125-Menge mCi	Endotoxin-Art und Menge	CAT-Menge - mg/ml -	$Na_2S_2O_5$-Menge - - -	Inkubationszeit sec	Ausbeute %
Nr. I (9)	1	E.coli 0,5	2,5	3	30	6,764
Nr. II (10)	1	E.coli *5	2,5	3	30	21,00
Nr. III (11)	1	E.coli 5	*5	*6	30	44,99
Nr. IV (12)	1	E.coli 5	5	6	*45	35,24
Nr. V (13)	1	E.coli 5	5	6	*15	21,60
Nr. VI (14)	1	E.coli *2,5	5	6	30	23,00
Nr. VII (15)	1	*S.equi 5	5	6	30	0,00
Nr. VIII (15)	1	S.equi 5	5	6	*45	0,00
Nr. IX (16)	1	S.equi *2,5	*25	*30	*60	3,06

* = veränderter Parameter

Abb. 9: Elutionsdiagramm des Versuchs Nr. I: geringe Markierungsausbeute von 6,764 % bei Ausgangsbeding.

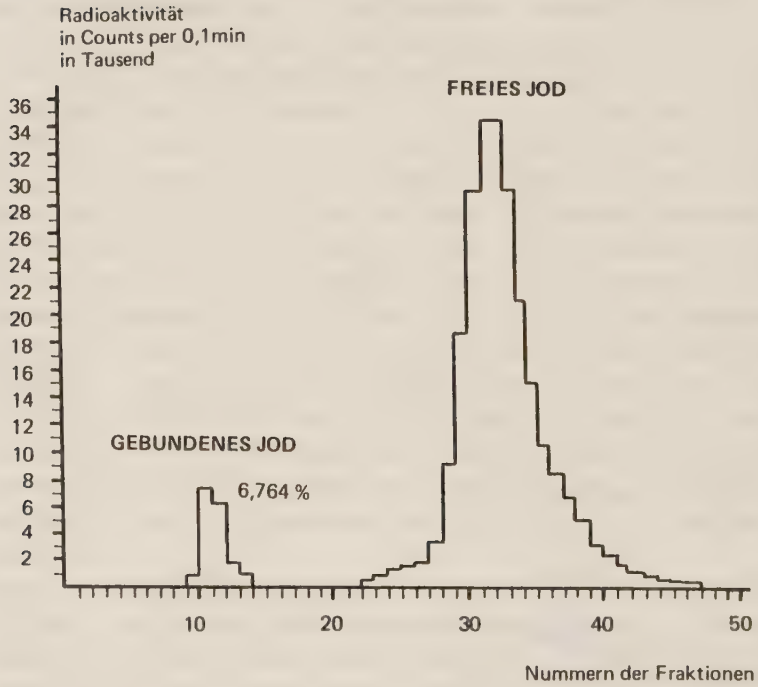


Abb. 10: Elutionsdiagramm des Versuchs Nr. II: Verzehnfachung der Endotoxinmenge ergibt eine Ausbeute von 21 %

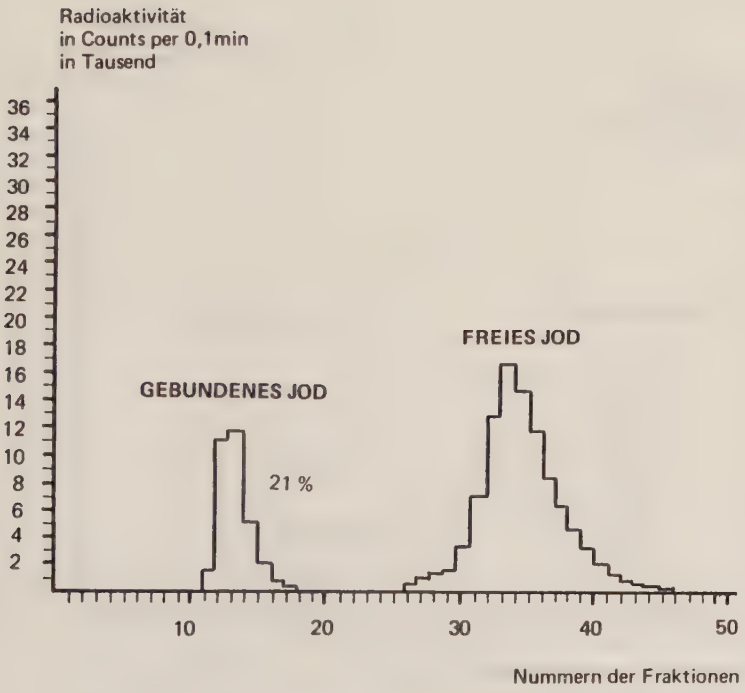


Abb. 11: Elutionsdiagramm des Versuchs Nr. III: zusätzlich zu Versuch Nr. II Verdopplung der CAT- und $Na_2S_2O_5$-Menge, ergibt eine Ausbeute von 44,99 %, optimale Versuchsbedingungen

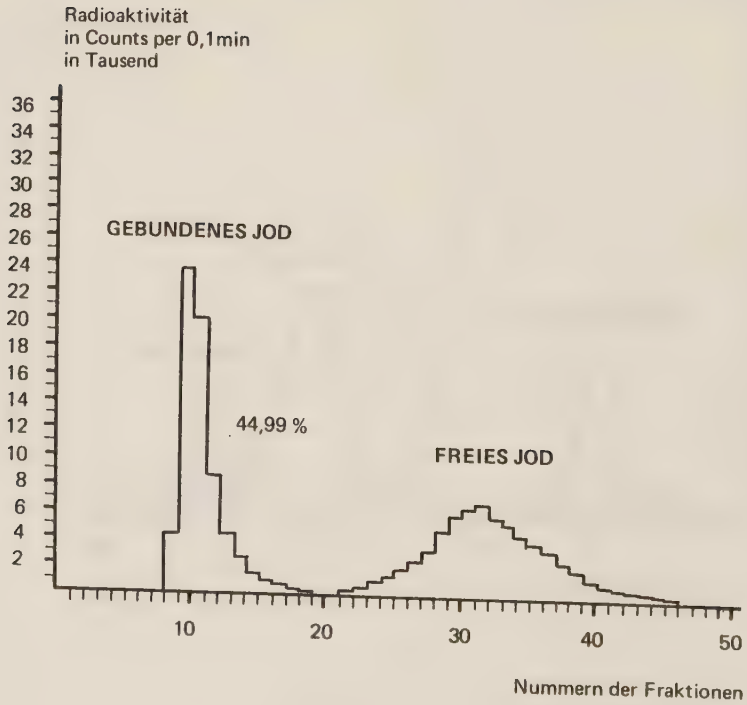


Abb. 12: Elutionsdiagramm des Versuchs Nr. IV: wie Versuch Nr. III nur Erhöhung der Inkubationszeit auf 45 sec, ergibt eine Ausbeute von 35,24 %

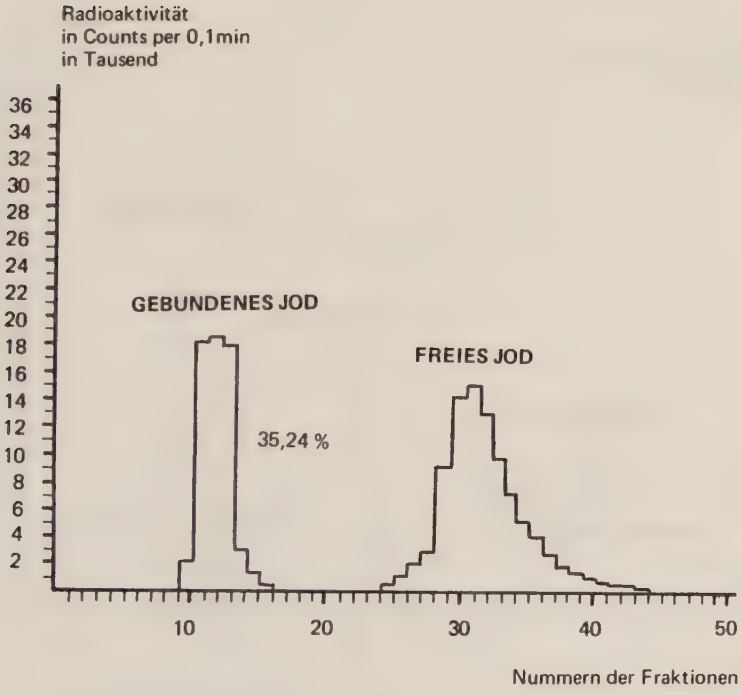


Abb. 13: Elutionsdiagramm des Versuchs Nr. V: wie Versuch Nr. III mit Erniedrigung der Inkubationszeit auf 15 sec, ergibt eine Ausbeute von 21,60 %

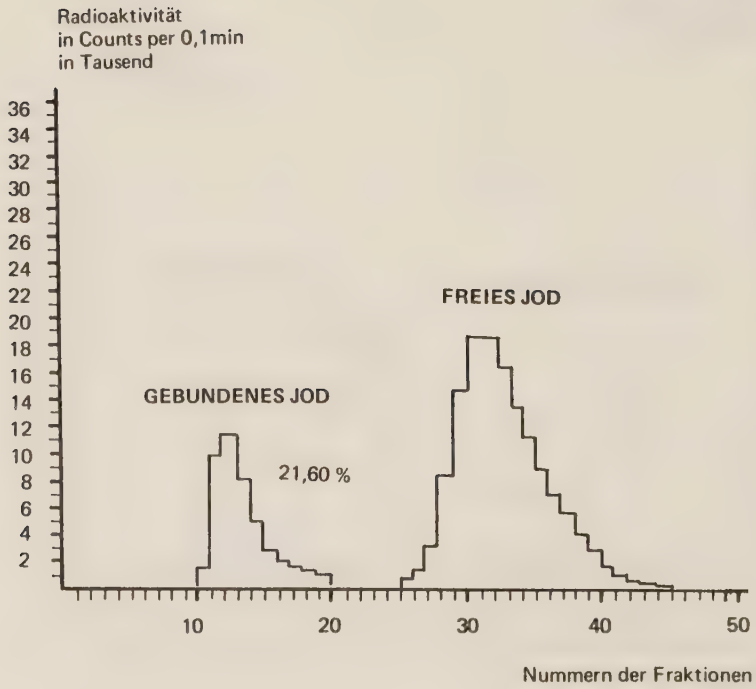


Abb. 14: Elutionsdiagramm des Versuchs Nr. VI: wie Versuch Nr. III aber mit der halben Endotoxinmenge, ergibt eine Ausbeute von 23 %

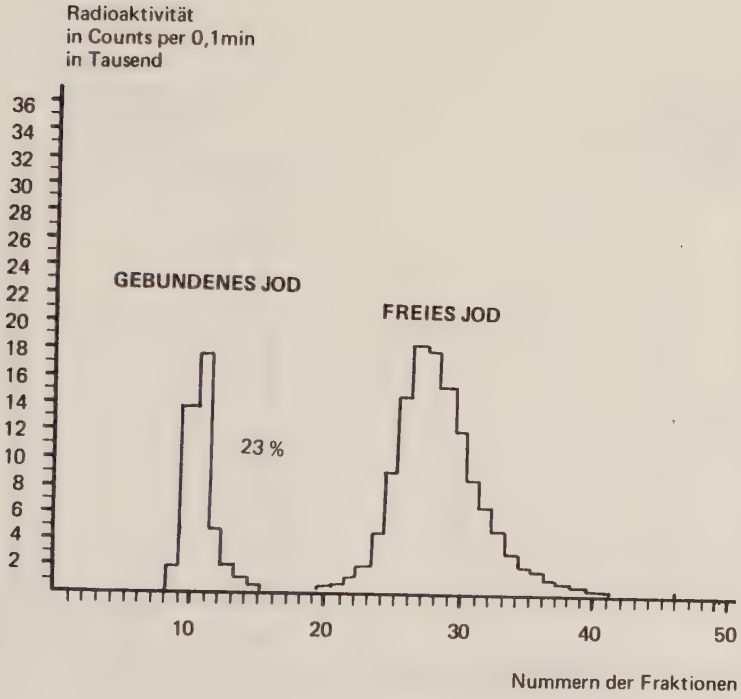


Abb. 15: Elutionsdiagramm der Versuche Nr. VII und Nr. VIII: Bedingungen wie Versuch Nr. III aber mit dem Endotoxin S.equi, außerdem eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 45 sec in Versuch Nr. VIII, erzielte Ausbeute 0 %

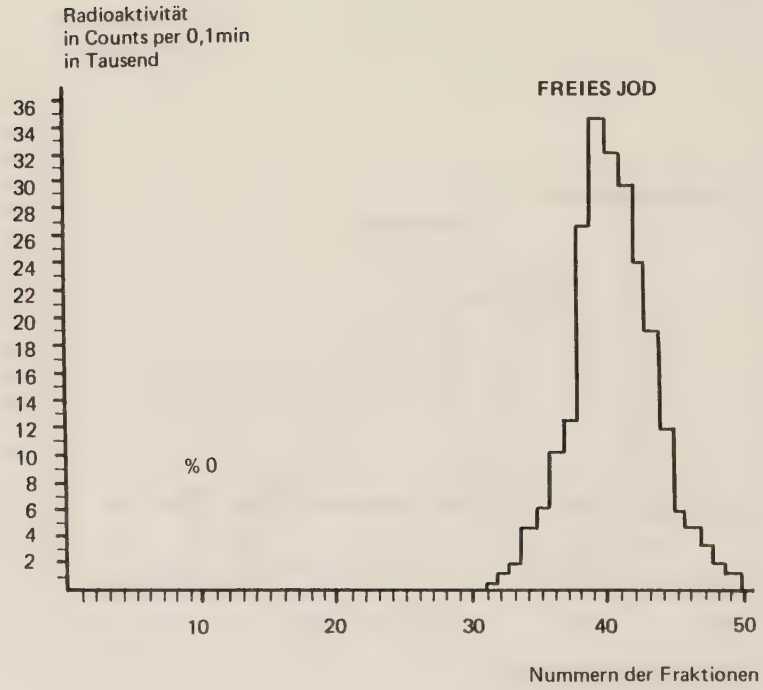
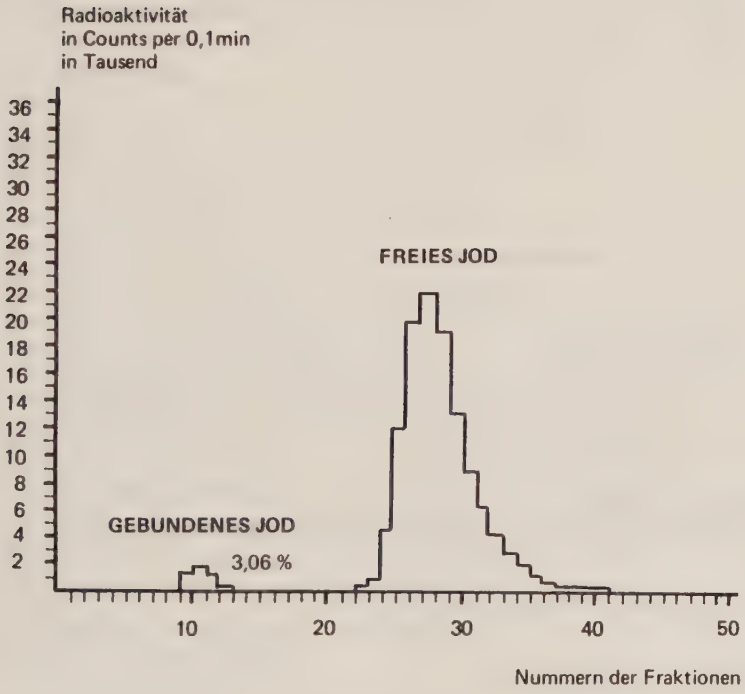


Abb. 16: Elutionsdiagramm des Versuchs Nr. IX: Endotoxin S.equi mit maximaler Konzentration von CAT und $Na_2S_2O_5$ mit einer Inkubationszeit von 60 sec, erzielte Ausbeute 3,06 %



4.2 Bolton-Hunter-Methode

Da die Greenwood-Hunter-Markierungsmethode bei dem Endotoxin von S.equi kein nennbar positives Ergebnis ergab, wurde mit Hilfe der Bolton-Hunter-Methode versucht, einen mit radioaktivem Jod markierten Tyrosylring an das Endotoxinmolekül zu koppeln und so zu einem positiven Markierungsergebnis zu gelangen. Als Vergleich wurde versucht, die Endotoxine von E.coli zu markieren.

4.2.1 Material und Geräte

4.2.1.1 Material

HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

Phosphatpuffer 0,05m
100 ml Phosphatpuffer 0,5m werden mit 900 ml H_2O bidest. verdünnt, ph kontrollieren (Herstellung von Phosphatpuffer 0,5m siehe 4.1.1.1).

Glycinlösung 0,2m
3,75 g Glycin werden in 250 ml Phosphatpuffer 0,05m gelöst.

HERSTELLUNG DER SÄULE (siehe 4.1.1.1)

REAGENZIEN

Bolton-Hunter-Reagenz
NEX 120 NS 110202 J-125
Radionukleotid Reinheit: 99 %
Radiochem. Reinheit: 99 %
Spezifische Aktivität: 2200 mCi/mol
Konzentration: 10 mCi/ml

Stickstoff N_2

Als Verdampfungsmittel

Endotoxin

a) Lipopolysaccharide B 3929-25 Bacto
E.coli 026:B_6 Control 558188

b) S.equi Freiburg, Prof. Dr. Lüderitz, Dr. Galanos

4.2.1.2 Geräte

Eisbad

Petrischale mit Eiswürfeln, 0°C

Bohrlochzähler

NaJ (TL)-Bohrlochszintillationsdetektor in Verbindung mit einem elektronischen Meßplatz
Abstand Probe/Zähler 30 cm

Fraktionssammler

"LKB Ultrova C, Fraction Collector" der Firma LKB Produkter AB, Stockholm-Bromma 1, Sweden
50 Zentrifugengläser numerieren, in den Fraktionssammler stellen
Einstellung des Fraktionssammlers:
8 Tropfen / Fraktion (≙ ca. 0,5 ml)
5 Racks (≙ 50 Gläsern)

Kohlefilter

wird von AMERSHAM BUCHLER mit dem Bolton-Hunter-Reagenz geliefert.
Beim Abdampfen des Lösungsmittels mit N_2 wird der Kohlefilter aufgesetzt, um die freiwerdenden radioaktiven Dämpfe abzufangen.

4.2.2 Durchführung

Das Lösungsmittel des, in Eis stehenden, Bolton-Hunter-Reagenz wird mit N_2 verdampft (Abb. 17). Anschließend wird das gelöste Endotoxin mit dem trockenen Rückstand des Bolton-Hunter-Reagenz 30 min inkubiert. Durch die Zugabe einer Glycinlösung wird die Reaktion beendet und nach einer weiteren Zugabe von Gelatinephosphatpuffer (keine Puffer mit Serumzusatz als Träger verwenden, da niedermolekulare Reaktionsprodukte wie Hydroxyphenylpropionsäure an Albumin binden) als Trägerprotein kann das Gemisch auf die Sephadex-Säule aufgetragen werden. Das erhaltene Eluat wird im Fraktionssammler gesammelt (8 Tropfen / 5 Racks, Laufzeit ca. 1 1/2 Std.) und anschließend im Bohrlochzähler gemessen. Die Errechnung der prozentualen Markierungsausbeute erfolgt wie bei 4.1.2.

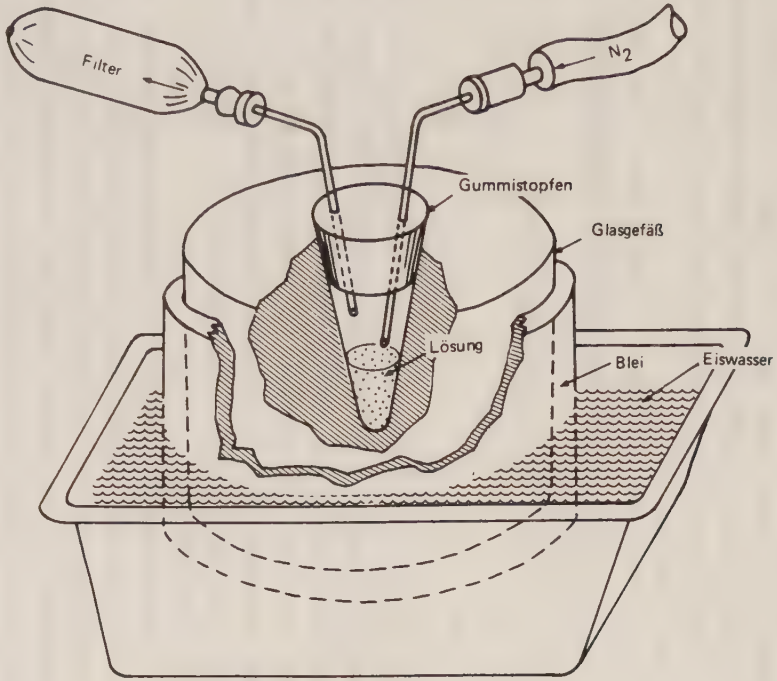
4.2.3 Versuchsbedingungen

Das Bolton-Hunter-Konjugationsverfahren wurde insgesamt 6mal durchgeführt. 3mal mit dem Endotoxin von E.coli und 3mal mit dem Endotoxin von S.equi.
Da sich weder das Endotoxin von E.coli noch das von S.equi auf diese Weise markieren ließ, wurde auf die graphische und tabellarische Darstellung der Versuche verzichtet.

4.2.4 Ergebnisse

Es konnte bei dem Versuch, die Endotoxine von E.coli und von S.equi mit Hilfe der Bolton-Hunter-Methode radioaktiv zu markieren, kein Ergebnis erzielt werden, welches mehr als 0,1 % Markierungsausbeute brachte. Somit ist diese Markierungsmethode für Endotoxine nicht geeignet.

Abb. 17: Versuchsanordnung zur Abdampfung des Lösungsmittels des Bolton-Hunter-Reagenz mittels N_2 (in Petrischale mit Eis gefüllt, Kohlefilter)



5 ANALYTISCHE ÜBERPRÜFUNG DER ENDOTOXINE

5.1 Auswahl der Methoden

Um eine eindeutige und unkomplizierte analytische Überprüfung der Endotoxine zu erhalten, wurde das Infrarotspektroskopie-Verfahren angewendet. Man machte sich dabei eine typische Eigenschaft der IR-Spektroskopie, wie Substanzidentifizierung durch Spektrenvergleich mit bekannter Referenzsubstanz, zunutze.

5.2 Die Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie)

5.2.1 Methode und Probenverarbeitung

METHODE

Die IR-Spektroskopie ist ein Verfahren zur quantitativen und qualitativen Analyse von organischen Verbindungen. Sie beruht auf der Auswertung der unterschiedlichen Absorptionsspektren der untersuchten Substanz im Infrarotbereich (Tab. 7).
Der normale Bereich des IR-Spektrums erstreckt sich von 4000 cm^{-1} bis etwa 667 cm^{-1} (ausgedrückt durch die reziproke Wellenzahl) (5).
Die unterschiedlichen Absorptionsspektren kommen durch Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit den Molekülen zustande. Die Moleküle werden durch die geeignete Wellenlänge in Schwingung versetzt, deren Schwingungsfrequenz für das Molekül und deren Bindung charakteristisch ist. Die Wellenzahl der funktionellen Gruppen (17) sind in Korrelationstabellen zusammengefaßt. Mit Hilfe dieser Tabellen lassen sich unbekannte Substanzen analysieren.

Tabelle 7: Die Haupteinsatzgebiete der IR-Spektrometrie (36, S. 22)

SUBSTANZIDENTIFIZIERUNG durch Spektrenvergleich mit bekannten Verbindungen

ERKENNEN von funktionellen Gruppen mit Hilfe einer Korrelationstabelle

STRUKTURAUFKLÄHRUNG unbekannter Verbindungen in Verbund mit anderen spektrometrischen Methoden

REINHEITSKONTROLLE von Chemikalien und Produkten aus der Labor- und Betriebspraxis

QUANTITATIVE Analyse von Gemischen

ERMITTLUNG molekularphysikalischer Größen, wie z. B. Kraftkonstanten und thermodynamischer Größen

PROBENVERARBEITUNG

Um Fremdbanden in den IR-Spektren zu verhindern, können die Proben in Tablettenform verarbeitet werden. Man stellt aus ca. 300 mg Kalium-Bromid-Pulver (KBr) und 1 - 2 mg der zu analysierenden Probe ein fein pulverisiertes Gemisch her. Anschließend wird daraus mit einem Preßwerkzeug mit $\sim$ 10 t/cm^2 unter Vakuum eine KBr-Tablette gepreßt. Man erhält einen glasklaren Preßling (Tab. 8).

5.2.2 Material und Geräte

5.2.2.1 Material

Es wurden folgende Endotoxine überprüft:

a) Endotoxin E.coli 026:B_6 Control 558188
Lipopolysaccharide B 3929-25 Bacto

b) Endotoxin S.equi Freiburg, Prof. Dr. Lüderitz, Dr. Galanos

Als Referenzsubstanz wurde Thyreostimulin (TSH, Thyreotropin, ORGANON TEKNIKA, Medizinische Produkte GmbH, 8042 Oberschleißheim) verwendet, da es typische Proteine und Proteinbindungen enthält und routinemäßig mit der Greenwood-Hunter-Methode markiert wird.

5.2.2.2 Geräte

Es wurde ein Infrarot-Spektrometer Nr. 580 der Firma PERKIN-ELMER, Überlingen, Bodensee verwendet.

5.2.3 Versuchsbedingungen

Etwa 1 mg des Endotoxins (E.coli, S.equi und Referenzsubstanz) wurden mit einigen mg KBr fein zerrieben und in einer Presse zu transparenten Tabletten gepreßt (KBr-Preßlinge).

Tabelle 8: Vorteile der KBr-Methode (36, S. 33)

KEINE störenden Absorptionsbanden
GUTE Transparenz
GERINGERER Arbeitsaufwand als bei Lösungsspektren
SCHÄRFERE Banden als bei Lösungsspektren
MÖGLICHKEIT der Aufbewahrung von KBr-Tabletten für spätere Untersuchungen

Zur Entfernung der Feuchtigkeit wurden die Preßlinge unter 100^{o} C im Vakuum getrocknet.
Die auf diese Weise hergestellten KBr-Preßlinge wurden in den Strahlengang des Spektrometers eingeführt und gegen eine Referenzsubstanz (KBr-Tablette ohne Zusatz) vermessen. Während einer Zeit von 10 min wurde die Meßung registriert (teilweise unter Ordinatendehnung).

5.2.4 Auswertung der IR-Spektren

Die auszuwertenden Spektren stammen von Endotoxinen S.equi und E.coli und von der Referenzsubstanz TSH. Alle Spektren wurden von KBr-Preßlingen aufgenommen.
Wie bei solchen Makromolekülen üblich, findet man ein diffuses Spektrum mit relativ geringer Feinstruktur (Abb. 18, 19). Die beiden Proben von S.equi und von E.coli geben zwar unterschiedliche Spektren, lassen aber eine gemeinsame Struktur erkennen. Auffällig bleiben die Unterschiede bei den Amidbanden bei 1650 und 1540 cm^{-1}. Bei der Probe von S.equi sind diese Banden quantitativ eindeutig geringer als bei der Probe von E.coli. Aufgrund der chemischen Struktur der beiden Endotoxine sind in den IR-Spektren aber gleich starke Amidbanden zu erwarten. Aus dem großen Intensitätsunterschied der Banden bei 1650 und 1540 cm^{-1} kann geschlossen werden, daß bei den Endotoxinen von E.coli eine starke Verunreinigung durch freie Proteine vorliegt. Die Probe von S.equi kann so als gereinigt und die Probe von E.coli als verunreinigt bezeichnet werden. Aus den Spektren ist weiterhin ersichtlich, daß beide Proben einen hohen Zuckeranteil (OH-Banden bei 3300 und 1100 cm^{-1}) und einen markanten Fettsäureanteil (Banden bei 2930, 2850, 1730 und 720 cm^{-1}) enthalten. Dieses Ergebnis bestätigt die bekannte Strukturanalyse (29).
Um jetzt einen Vergleich in der Intensität von Aminosäurebanden zu erhalten, wurde eine Referenzsubstanz vermessen, die typisch starke Proteinspektren bietet.

Abb. 18: IR-Spektren von S.equi ohne deutlich erkennbare Proteinbanden bei 1650 und 1540 cm^{-1} (minimaler Proteinanteil)

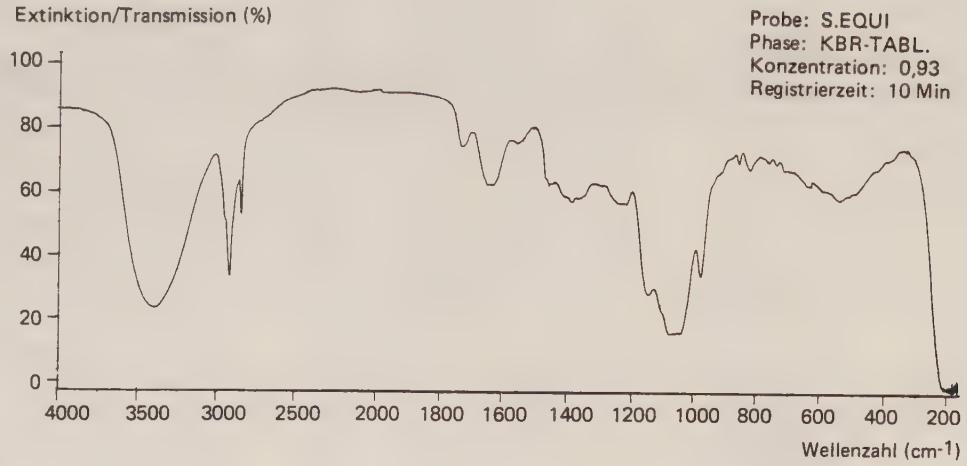
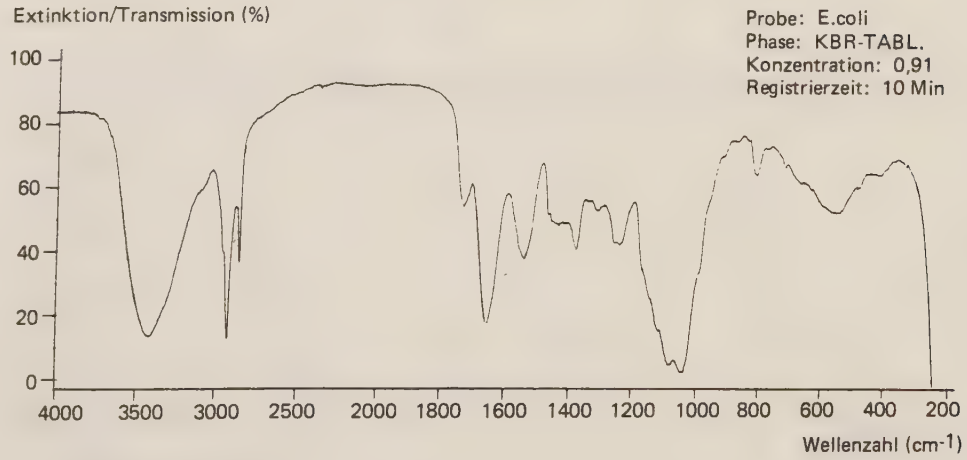


Abb. 19: IR-Spektren von E.coli mit deutlich erkennbaren Proteinbanden bei 1650 und 1540 cm^{-1} (starker Proteinanteil)

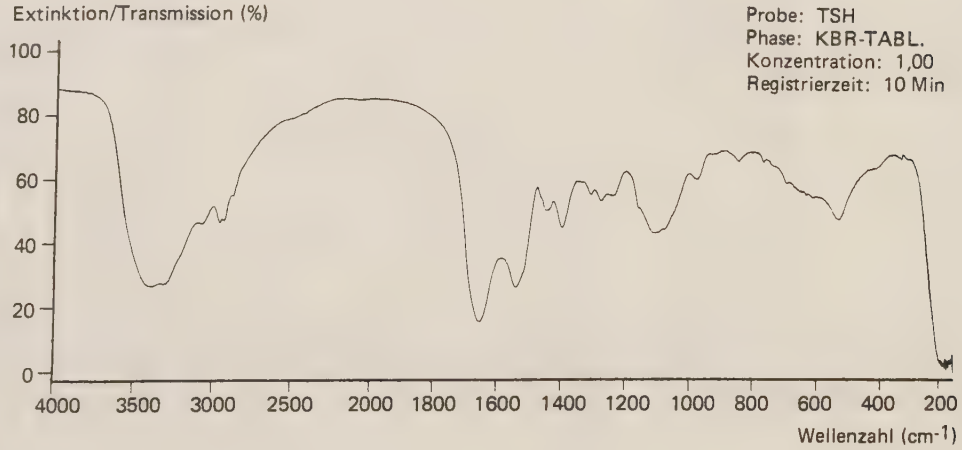


Als solche Referenzsubstanz bietet sich TSH an (Abb. 20). In den Spektren der Referenzsubstanz TSH stellen die Amid-C=O-Gruppen bei 1650 cm^{-1} und die NH-Banden bei 1540 cm^{-1} die stärksten Banden dar. Ebenso markant zeigen sich die OH-Banden bei 3300 und bei 1100 cm^{-1} (C-O-Einfachbindung). Die Referenzsubstanz bietet somit die erwünschten Amidbanden, in ausreichender Intensität.

6 DISKUSSION

Es wird in dieser Arbeit versucht, das Problem, Endotoxine von E.coli radioaktiv zu markieren, zu lösen und schon vorhandene Methoden zu überprüfen. Dabei wurde in erster Linie auf eine von ULEVITCH 1977 (32) veröffentlichte Arbeit Bezug genommen.
Der Autor beschreibt unter anderem eine Markierungsmethode nach GREENWOOD-HUNTER (Oxidierung mit Chloramin T) mit Na-125-Jod. Bei dieser Markierung bindet sich das Jod vorzugsweise an die in Proteinen häufig vorhandenen Tyrosylreste. Der Autor verwendet dabei das Endotoxin von E.coli, LPS, $O111:B_4$ aus den USA. Der erhaltene Markierungserfolg wurde, nach Meinung des Autors, mittels einer chemischen Reaktion, deren Lokalisation nicht bekannt ist, an vorhandenen freien Aminopruppen erklärt. Der Autor räumt weiter ein, daß ein geringer Teil freier Aminogruppen durch eine unvollständige Reinigung (Verunreinigung durch Proteine) vorhanden sein können.
Es wurde nun versucht, mit zwei verschiedenen Endotoxinen das von ULEVITCH erreichte Ergebnis zu reproduzieren und unter Modifizierung der Versuchsparameter in Hinblick auf den Markierungsort zu überprüfen. Dabei diente eine der beiden Endotoxine, S.equi, als Referenzsubstanz, da für dieses Endotoxin genaue Angaben über Struktur und Reinheitsgrad vorlagen. Das andere verwendete Endotoxin (E.coli) gleicht dem in der Arbeit von ULEVITCH verwendeten Endotoxin. Es lagen keinerlei Angaben über einen Reinheitsgrad vor.

Abb. 20: IR-Spektren von TSH (Referenzsubstanz) dessen starker Proteingehalt bekannt ist (starke Banden bei 1650 und 1540 cm^{-1}, starke Verunreinigungen)



Es wurde nun das Greenwood-Hunter-Verfahren zuerst bei E.coli angewandt und das Versuchsergebnis durch Modifizierung der einzelnen Versuchsparameter optimiert. Anschließend sollte S.equi nach der optimalen Versuchsanordnung auch radioaktiv markiert werden. Dies gelang aber auch nach maximaler Konzentrierung der Versuchsparameter nicht (im Gegensatz zu E.coli), so daß sich erstmals die Vermutung äußerte, daß bei E.coli nur Verunreinigungen markiert worden sind und daß somit bei der gereinigten Substanz (S.equi) keine Bindungsstellen für das oxidierte Jod vorhanden sein können.
Das negative Ergebnis von S.equi gab den Anlaß, eine andere Methode nach BOLTON-HUNTER anzuwenden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Koppelung eines Tyrosylähnlichen Moleküls (NSHPP), das zuvor mit Na-125-Jod nach GREENWOOD-HUNTER markiert wurde, an freie Aminogruppen. Sind solche Aminogruppen nicht vorhanden oder aufgrund der räumlichen Struktur des Moleküls blockiert, läßt sich die Bolton-Hunter-Methode nicht mit positivem Ergebnis durchführen.
Bei der Durchführung der Bolton-Hunter-Methode konnte weder bei S.equi noch bei E.coli ein positives Ergebnis erzielt werden. Das negative Ergebnis bei S.equi bestätigte die Vermutung, daß bei S.equi keine Bindungsstellen für oxidiertes Jod vorhanden sind. Bei dem Ergebnis von E.coli wurde dagegen vermutet, daß bei den offenbar vorhandenen Proteinverunreinigungen die Bindungsstellen der Aminogruppe besetzt sind (z. B. durch Tyrosylreste) und somit die Anlagerung eines tyrosylähnlichen Moleküls verhindert wird.
Um nähere Kenntnisse über den Reinheitsgrad unserer beiden Endotoxine zu erhalten, wurde eine Analyse mittels IR-Spektroskopie unter Vergleich einer Referenzsubstanz (TSH) durchgeführt. Es wurde dabei folgendes festgestellt: Deutlich erkennbar sind C-O-Banden und Amid-Banden, die auf das Vorhandensein von Proteinen schließen lassen. Die Endotoxine von E.coli müssen somit als stark verunreinigt betrachtet werden. S.equi dagegen besitzt einen hohen Reinheitsgrad.
Die durchgeführten Versuche haben somit die Annahme erhärtet,

daß bei dem positiven Markierungsergebnis mit E.coli sich das radioaktive Jod an Proteinen, die nicht zum E.coli-Molekül gehören, angelagert hat. Bei S.equi konnten die Markierungsergebnisse nicht reproduziert werden, da diese Substanz in garantiert gereinigter Form vorlag.
Bei der Arbeit von ULEVITCH lagen keine Angaben über den Reinheitsgrad des verwendeten Endotoxins vor. Die oben beschriebenen Versuche lassen bezweifeln, daß in dieser Arbeit tatsächlich die Endotoxine markiert wurden. Eine Jodmarkierung mit Chloramin T nach GREENWOOD-HUNTER eignet sich nicht für Endotoxine. Auch eine Markierung nach BOLTON-HUNTER ist ungeeignet.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde in Anlehnung an eine Arbeit von ULEVITCH (32) mittels Na-125-Jod nach GREENWOOD-HUNTER das Endotoxin von E.coli markiert, um anschließend mehr Information über den biologischen Angriffsort des Endotoxins im Organismus durch Tierversuche zu erfahren. Dabei diente Endotoxin von S.equi als Referenzsubstanz, da über dieses Endotoxin genauere Informationen über Struktur und Reinheitsgrad vorlagen.

- Es konnte bei dem Endotoxin von E.coli eine Markierungsausbeute von 44,99 % erzielt werden, die sich aber mit dem Endotoxin von S.equi nicht reproduzieren ließ.

- Deshalb wurde eine weitere Markierungsmethode nach BOLTON-HUNTER durchgeführt, die aber kein positives Ergebnis zeigte.

- Aufgrund des negativen Ergebnisses wurde eine Analyse mittels IR-Spektroskopie durchgeführt, um genauere Aussagen über einen möglichen Verunreinigungsgrad machen zu können.

- Das Ergebnis dieser Analyse, gekoppelt mit den Ergebnissen der durchgeführten Versuche, bestätigte die Vermutung, daß das bei E.coli erzielte Ergebnis von 44,99 % auf einer Markierung von Verunreinigungen beruhte und daß weder das Markierungsverfahren nach GREENWOOD-HUNTER noch das nach BOLTON-HUNTER für eine radioaktive Markierung von Endotoxinen geeignet ist.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1) BEGER, H. G., Gögler, H., Kraas, E., Bittner, R.:
Endotoxin bei bakterieller Peritonitis
Chirurg 52: 81 - 88, (1981)

2) BOLTON, A.E. and Hunter, W.M.:
The Labelling of Proteins to High Spezific Radioactivities by Conjugation to a ^{125}J-Containing Acylating Agent.
Biochem. J. 133: 529 - 539, (1973)

3) BOLTON, A. E.:
Immunoassay Research and Development Unit.
The Medical College of St. Bartholomew`s Hospital,
London E.C.I.

4) BOLTON, A. E., Bennie, J. G. and Hunter, W. M.:
In Properties of the biological fluids.
24th colloquium, edited by Peeters, H., Oxford,
Pergamon press: 736, (1977)

5) COOPER, J. F., Levin, J. und Wagner, H. N.:
Quantitative Comparison of In Vitro and In Vivo Methods for the Detection of Endotoxin.
J. Lab. Clin. Med. 78: 138, (1971)

6) COOPER, J. F.:
Principles and Applications of the Limulus Test for Pyrogen in Parenteral Drugs.
Bull. Patent. Drug Assoc. 29: 122, (1975)

7) DANIELE, R., Singh, H., Appert, H. E., Pairent, F.W., Howard, J. M.:
Lymphatic absorbtion of intraperitoneal endotoxin in the dog.
Surgery 67: 404, (1970)

8) DAS, J., Schwartz, A. A., Folkman, J.:
Clearance of endotoxin by platelets: Role in increasing the accuracy of the Limulus gelation test and in combating experimental endotoxemia.
Surgery 74: 235 - 240, (1973)

9) ECKERT, P.:
Septischer Schock.
J. Klinikarzt 10: 634 - 643, (1981)

10) FELLOW, R. E. and Bolander, F. F.:
Growth hormone covalently bound to sepharose or glass. Analysis of ligand release rates and characterization of soluble radiolabelled products.
Biochemistry 14: 2938 - 2943, (1975)

11) FREUDENBERG, M. and Galanos, C.:
Interaction of Lipopolysaccharides and Lipid A with Complement in Rats and Its Reaction to Endotoxicity.
Infection and Immunity: 875 - 882, (1978)

12) GALANOS, C., Lüderitz, O. and Westphal, O.:
Preparation and Properties of Antisera against the Lipid-A Component of Bacterial Lipopolysaccharides.
Eur. J. Biochem. 24: 116 - 122, (1971)

13) GALANOS, C. and Lüderitz, O.:
The Role of the Physical State of Lipopolysaccharides in the Interaction with Complement.
Eur. J. Biochemistry 65: 403 - 408, (1976)

14) GALANOS, C., Freudenberg, M. A., Hase, S., Jay, F. und Ruschmann, E. (1977a):
Biological activities and immunological properties of lipid A.
Microbiology: 269, (1977)

15) GALANOS, C., Freudenberg, M. und Jay, F.:
Biologie der Endotoxine Gram-negativer Bakterien.
Arzneim.-Forsch. / Drug Res. 28 (II), 7: 1202, (1978)

16) GALANOS, C., Freudenberg, M. A., Lüderitz, O., Rietschel, E. T. and Westphal, O.:
Chemical, Physiochemical and Biological Properties of Bacterial Lipopolysaccharides.
Biomed. Applic. of the Horseshoe Crab: 321 - 332, (1979)

17) GREENWOOD, F. C., Hunter, W. M. and Glover, J. S.:
The preparation of 131-labelled human growth hormone of high spezific radioactivity.
Biochem. J. 89: 114 - 123, (1963)

18) HAGENSTEIN, Cleve, Hoyer und Seeger:
Chemie - Funktionelle Gruppen.
Verlag Diesterweg, Salle, (1982)

19) HUNTER, W. M. and Greenwood, F. C.:
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high spezific activity.
Nature 194: 495 - 496, (1962)

20) KIM, Y. B. und Watson, D. W.:
Biologically active endotoxins from Salmonella mutants deficient in O- and R-polysaccharides and heptose.
J. Bacteriol. 94: 1320, (1967)

21) KLEINE, B.:
Das Schicksal von bakteriellem Lipopolysaccharid in vivo. Untersuchungen über die Ausscheidung von Lipopolysaccharid und von metabolischen Lipopolysaccharid-Derivaten durch Meerkatzen und Ratten.
Inaugural-Dissertation, Freiburg, (1980)

22) KOSLOWSKI, L., Irmer, W. und Bushe, K.-A.:
Lehrbuch der Chirurgie.
Schattauer-Verlag: 36 - 37, (1978)

23) LIEHR, H. und Grün, M.:
Endotoxin-induced liver necrosis and intravascular coagulation in rats enhanced by portacaval collateral circulation.
Gut 16: 429 - 436, (1975)

24) LÜDERITZ, O., Staub, A. M. und Westphal, O.:
Immunochemistry of O- and R-antigens of Salmonella and related Enterobacteriaceae.
Bacteriol. Rev. 30: 192, (1966)

25) LÜDERITZ, O., Galanos, C. und Mitarbeiter:
Lipid A: Chemical Structure and Biological Activity.
The Journal of Infectious Diseases 128: Supplement, (1973)

25a) LÜDERITZ, O., Galanos, C., Lehmann, V., Mayer, H., Rietschel, E. Th. and Weekesser (1968):
Chemical Structure and Biological Activities of Lipid A`s from Various Bacteriae Families.
Naturwissenschaften 65: 578 - 585, (1978)

26) von zur MÜHLEN, A.:
Endokrinologie; Grundlagen des radioimmunchemischen Hormonnachweises.
Lehrbuch

27) NIKAIDO, H. und Nakae, T.:
The outer membrane of Gram-negative Bacteria.
Aus: Advances in microbial physiology, Rose, A. H. und Morris, J. G. (Ed.) 20: 163, (1979)

28) NOLAN, P. J.:
The Role of Endotoxin in Liver Injury.
Gastroenterology 69: 1346 - 1356, (1975)

29) RIETSCHEL, E. Th., Broady, K., Jensen, M., Wollenweber, H., Lüderitz, O. und Westphal, O.:
Die chemische Struktur Bakterieller Lipopolysaccharide, Endotoxin.
(Persönliche Mitteilung)

30) RUDINGER, J. and Ruegg, U.:
Preparation of N-Succinimidyl 3-(4-Hydroxyphenyl)propionate.
Biochem. J. 133: 538 - 539, (1973)

31) SCHNAITMAN, C. A.:
J. Bacteriol. 108: 553, (1971)

32) ULEVITCH, R. J.:
The Preparation and Characterization of a Radioiodinated Bacterial Lipopolysaccharide.
Immunochemistry 15: 157 - 164, (1978)

33) WEIL und Felix:
Untersuchungen über die gewöhnlichen Proteinstämme und ihre Beziehungen zu den X-Stämmen.
Wien, Klin. Wochenschr. 31 (23): 637, (1918)

34) WEIL und Felix:
Über die Doppelnatur der Rezeptoren bei Paratyphus B.
Wien, Klin. Wochenschr. 31 (23): 986, (1918)

35) WESTPHAL, O. und Lüderitz, O.:
Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gramnegativer Bakterien.
Angew. Chemie 66: 407, (1954)

36) WILLIAMS, D. H., Flemming, I.:
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie.
Thieme Verlag-Stuttgart, (1968)

9 DANKSAGUNGEN

Für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Professor Dr. med. Rudolf Häring.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Herbert Sörje für die unermüdliche Unterstützung und Beratung.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. Meinhold für die Hilfestellung während der Arbeit.

Für die Anregungen bei der Themenstellung danke ich Herrn Dr. Walter Vosberg.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Seeger von der Schering AG für die Unterstützung bei der analytischen Überprüfung der Endotoxine danken.

Außerdem bin ich Herrn Professor Dr. med. Oeff sehr dankbar für die freundlicherweise erteilte Genehmigung, die radiochemischen Versuche am Institut für Nuklearmedizin des Klinikums Berlin-Steglitz durchzuführen.

Für die Hilfe bei der graph. Gestaltung der Arbeit danke ich der Graph. Abteilung des Klinikums Berlin-Steglitz.

10 LEBENSLAUF

Name	Bettina Steinmüller
geboren	2. Januar 1959 in Berlin, Konf.: ev.
Eltern	Dipl.-Ing. Hans-Friedrich Steinmüller Abteilungsleiter i. R.
	Erika Steinmüller geb. Smolka Kunstdozentin
Schulausbildung	1965 - 1971 Barnim-Grundschule Berlin 1971 - 1977 Beethoven-Oberschule Berlin 1977 Abitur, Gesamtnote 1,6
Studium	1977 Studienbeginn Humanmedizin FU Berlin
	1978 2 Monate Krankenpflegepraktikum im Krankenhaus Moabit, Berlin
	1979 Physikum
	1980 1 Monat Famulatur in einer Praxis für Kinderheilkunde und Allgemeinmedizin
	1980 1. Staatsexamen
	1981 1 Monat Famulatur in einer Praxis für Gynäkologie und Geburtshilfe
	1981 1 Monat Famulatur in der Rettungsstelle des Krankenhauses Moabit

Fortsetzung
Studium

1982 1 Monat Famulatur in der Chirurgischen Wachstation des Auguste-Viktoria-Krankenhauses

1983 2. Staatsexamen

1983 - 1984 Praktisches Jahr in Berlin
- Gynäkologie bei
Herrn Prof. Dr. med. Börner
Geburtshilfe bei
Herrn Prof. Dr. med. Saling
Krankenhaus Neukölln, Mariendorfer Weg

- Chirurgie bei
Herrn Prof. Dr. med. Dreßler
Krankenhaus Spandau, Lynarstr.

- Innere Medizin bei
Frau Prof. Dr. med. Boll
Hämatologische und Gastroenterologische Abteilungen
Krankenhaus Neukölln, Rudower Str.

1984 3. Staatsexamen

1984 Approbation als Arzt